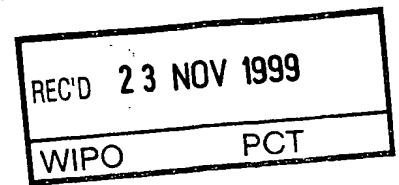


DE 99 / 208 17 62 76 7

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



## Bescheinigung

Die VASOPHARM BIOTECH GMBH & CO KG in Veitshöchheim/Deutschland hat  
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Isolierte und gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase  
 $\alpha 1/\beta 1$  (hsGC  $\alpha 1/\beta 1$ )"

am 14. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Sitz der Anmelderin wurde geändert in: Würzburg/Deutschland.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
C 12 N 9/08 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weihmayr

Aktenzeichen: 198 37 015.6

Neue deutsche Patentanmeldung  
VASOPHARM BIOTECH GMBH & CO. KG  
Unser Zeichen: 197-2

14. August 1998  
VO/MG/sti



5

### Zusammenfassung

Beschrieben ist die Expression der cDNA-Klone für die Untereinheiten a1 (hsGCa1) und b1 (hsGC b1) der humanen löslichen Guanylylcyclase und die nachfolgende  
10 Aufreinigung des aktiven Enzyms und dessen Anwendung, die medizinische Anwendung der Expression dieser Klone durch Gentransfer, sowie Antikörper gegen aus der Sequenz abgeleitete Peptide und deren Anwendung.

5

## Isolierte und gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ )

### Das technische Gebiet der Erfindung

10

Die vorliegende Erfindung betrifft die Expression der cDNA-Klone für die Untereinheiten  $\alpha 1$  (hsGC $\alpha 1$ ) und  $\beta 1$  (hsGC $\beta 1$ ) der humanen löslichen Guanylylcyclase und die nachfolgende Aufreinigung des aktiven Enzyms und dessen Anwendung, die medizinische Anwendung der Expression dieser Klone

15 durch Gentransfer, sowie Antikörper gegen aus der Sequenz abgeleitete Peptide und deren Anwendung.

### Diskussion des Standes der Technik

20

Das körpereigene NO/cGMP Signalsystem vermittelt wichtige Funktionen wie Vasodilatation, Hemmung der Thrombocytenaggregation, Neurotransmission und Immunabwehr und ist auch an der Entstehung verschiedener Erkrankungszustände wie Ischämie-Reperfusion und Entzündungsschäden beteiligt (Schmidt und Walter,

25 1994). Daher ist das NO/cGMP-System seit langem ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Pharmaka zur Therapie der koronaren Herzkrankheit, Thromboseneigung, Herzinsuffizienz, Angina pectoris, des kardial bedingten Lungenödems, hypertensiver Krise, Entzündungs- und Infarktzuständen. Bisher werden hier verschiedene sogenannte NO-Donoren wie Glyceroltrinitrat u.a.

30 eingesetzt, die NO freisetzen, dadurch endogenes NO ersetzen und lösliche Guanylylcyclase (sGC) aktivieren (Abb. 1). sGC bildet cGMP, das seinerseits über

hsGCα1 bezeichnete Sequenz veröffentlicht (Accession-Nr. U58855), der die

Sequenzunterschiede zu sGC $\alpha$ 1 von Rind und Ratte in den Bereichen S1 und S2 fehlen. Außerdem wurde in der GenBank kürzlich auch eine alternatives Spleißprodukt zur hsGC $\beta$ 3 veröffentlicht (Accession-Nr. AF020340), das dort als alternativ gespleißte Form der hsGC $\beta$ 1 bezeichnet wird. Die physiologische Bedeutung dieser Spleißvariante von hsGC $\beta$ 1/3 ist jedoch völlig unklar. Damit stellt sich die Frage, welche dieser Isoformen für welche physiologischen Funktionen in welchen Zelltypen verantwortlich ist.

Derzeit gibt es außerdem keine Antikörper gegen die humane sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1, die monospezifisch sind, gegen die humanen Sequenzen gerichtet und deren Eignung für den Immunoblot mit humanen Geweben nachgewiesen worden ist. Bisher veröffentlichte Peptidantikörper zeigen diese Eigenschaften nur zum Teil: Harteneck et al. und Guthmann et al. verwenden eine Peptidsequenz (VYKVETVGDKYMTVSGLP), die in Guanylylcyclasen recht hohe Konservierung zeigen, so daß eine Kreuzreaktion auch mit partikulären Guanylylcyclasen (z.B. GC-C) erwartet werden kann. Guthmann et al. verwendet eine zu hsGC $\beta$ 1 identische Peptidsequenz (YGPEVWEDIKKEA) und eine bis auf zwei Aminosäureaustausche identische Peptidsequenz zu hsGC $\alpha$ 1 (KKDVEEANANFLGKASGID). Allerdings ist die Funktion dieser Antikörper im Immunoblot nur für *angereinigte* hsGC aus humanen Thrombozyten gezeigt. Zusätzlich erkennen die Antiseren gegen hsGC $\alpha$ 1 noch ein zweites, unspezifisches Produkt. Humbert et al. und Koesling et al. verwenden eine Peptidsequenz (SRKNTGTEETEQDEN) aus Rinder-sGC $\beta$ 1, die teilweise (Aminosäuren 1-10) mit dem hier verwendeten Peptid (Aminosäuren 13-22) für humane sGC $\beta$ 1 überlappt und dort identisch ist, dessen C-Terminus (Aminosäuren 11-15) jedoch deutlich verschieden von der humanen Sequenz ist. Das Antiserum gegen dieses Peptid wurde jedoch nicht an humanem Protein getestet, sondern nur für die Immunpräzipitation der bovinen sGC verwendet.

Damit standen von der für die kardiovaskuläre Forschung wichtigen humanen Isoform  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 weder *natives* Protein, noch *rekombinantes* Protein, ein einstufiges

Reinigungsprotokoll oder spezifische Antikörper zur Verfügung. Auch ein Ansatz zur Gentherapie (z.B. mit Adenoviren o. ä.) ist bisher nicht beschrieben.

## 5 Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem

Um neue Pharmaka oder Gentransfertechniken für die kardiovaskuläre Therapie finden zu können, die weder zur Toleranz beim Patienten führen noch zytotoxisches Peroxynitrit bilden, ist eine NO-unabhängige Aktivierung von humaner sGC  $\alpha 1/\beta 1$  ein erfolgversprechender Ansatz. Um solche Pharmaka zu finden, ist ein Massenscreening nach geeigneten Wirkstoffen erforderlich. Ein solches Pharmakascreening nach spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren ist im Tierversuch zu teuer und wegen Speziesunterschieden, möglichen Nebenwirkungen und Effekten auf andere Isoformen nicht sinnvoll. Zellkultursysteme haben den Nachteil, daß nur mit erheblichem Mehraufwand festgestellt werden kann, wo Substanzen innerhalb der Signalkaskaden ihre Wirkungen entfalten. Außerdem ist die Zellkultur kostenintensiv und empfindlich. Die Aufreinigung eines Proteins aus tierischen Geweben ist aufwendig bei geringerer Ausbeute. Vor allem aber sind die Ergebnisse eines solchen Screenings aufgrund der Speziesunterschiede nur bedingt übertragbar. Hier stellt sich insbesondere die Frage nach der Bedeutung der Isoformen hsGC $\alpha 1$  und hsGC $\alpha 3$  sowie die Frage, ob hsGC $\beta 3$  tatsächlich einer humanen hsGC $\beta 1$  entspricht. Dies ist wichtig, um das richtige Zielprotein für ein pharmakologisches Screening oder eine Gentherapie auszuwählen. Für ein optimales Screening müßte das humane Homolog des Proteins sGC  $\alpha 1/\beta 1$  in großen Mengen aufgereinigt und kostengünstig zur Verfügung stehen. Eine Aufreinigung großer Mengen humanen nativen sGC- $\alpha 1/\beta 1$ -Proteins aus entsprechend humanem Gewebe ist nicht möglich. Daher sind für das Pharmakascreening andere Methoden nötig. Zusätzlich gibt es keine geeigneten Antikörper zum Nachweis der humanen sGC $\alpha 1/\beta 1$ , deren Eignung für diagnostische Zwecke z.B. im normalen Immunoblot, ELISA, RIA, EIA o.ä., gezeigt ist. Auch gibt es bisher keinen Ansatz für die

therapeutisch genutzte, künstliche Expression von hsGC durch Gentransfer im Menschen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, isolierte und gereinigte humane sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung und Reinigung bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Antikörper gegen die humane sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 bereitzustellen. Außerdem ist es Aufgabe der Erfindung, Expressionsvektoren auf Basis von Adenoviren bereitzustellen, welche die cDNA der humanen sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 enthalten. Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, die humane sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 gereinigt und in handhabbaren Mengen bereitzustellen für ein Pharmakascreening nach Modulatoren, Inhibitoren und Aktivatoren der humanen sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1.

#### Die Lösung des technischen Problems

Die Lösung des vorstehenden technischen Problems wird erreicht durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen und die nachstehenden Erläuterungen der Erfindung.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine isolierte und zur apparenten Homogenität gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 (hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der Untereinheit  $\alpha$ 1 und/oder  $\beta$ 1 der humanen löslichen Guanylylcyclase, umfassend die Expression von die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha$ 1 und/oder hsGC $\beta$ 1 enthaltenden Expressionsvektoren in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen und Gewinnung der Untereinheit bzw. der Untereinheiten.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der Untereinheit  $\alpha$ 1 und/oder  $\beta$ 1 der humanen löslichen

Guanylylcyclase umfaßt der Schritt der Gewinnung der Untereinheit bzw. der Untereinheiten die Lyse der Zellen, die Affinitätschromatographie des Zell-Lysats und die anschließende Elution der Untereinheit bzw. der Untereinheiten.

- 5 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der Untereinheit  $\alpha 1$  und/oder  $\beta 1$  der humanen löslichen Guanylylcyclase enthält der Expressionsvektor zusätzlich mindestens eine DNA-Sequenz für eine Domäne zur spezifischen Affinitätschromatographie (Affinitätstag) mit anhängender Proteaseschnittstelle.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha 1/\beta 1$  (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ ), umfassend die getrennte Expression eines die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha 1$  oder hsGC $\beta 1$  enthaltenden Expressionsvektors in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen,  
15 Gewinnung der Untereinheiten und Kombinieren der Untereinheiten hsGC $\alpha 1$  und hsGC $\beta 1$  zur dimeren Guanylylcyclase  $\alpha 1/\beta 1$  (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ ).

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha 1/\beta 1$  (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ ) umfaßt die  
20 Koexpression der DNA-Sequenzen für hsGC $\alpha 1$  und hsGC $\beta 1$  in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, die Lyse der hsGC $\alpha 1$  und hsGC $\beta 1$  enthaltenden Zellen, die Affinitätschromatographie und die anschließende Elution von hsGC $\alpha 1/\beta 1$ .

- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die Untereinheit hsGC $\alpha 1$  und/oder hsGC $\beta 1$  der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha 1/\beta 1$  kodiert, für die somatische Gentherapie, insbesondere zur Prävention und Therapie von Arteriosklerose und ihren Folgeerkrankungen, von Restenose, Ischämie (Infarkt), peripheren arteriellen



Verschlußkrankheiten und arterieller Hypertonie sowie zur Prävention bei Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden Adenovektoren mit hsGC $\alpha$ 1- oder hsGC $\beta$ 1-cDNA für die somatische Gentherapie eingesetzt. Jedoch können auch andere Vektorsysteme für eine gentherapeutische medizinische Nutzung verwendet werden.

10 Die erfindungsgemäß beschriebenen Methoden zum Gentransfer können auch für den Gentransfer für die humane lösliche Guanylylcyclase  $\alpha$ 2 (GenBank: x63282) und für das humane Homolog zur löslichen Guanylylcyclase  $\beta$ 2 (aus Ratte; GenBank: m57507) und für andere humane lösliche Guanylylcyclasen angewendet werden.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Antikörper gegen humane lösliche Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 (hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1), erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1, der Untereinheit  $\alpha$ 1 oder  $\beta$ 1 immunogenen oder Peptidfragmenten davon und Isolieren der Antikörper.

Die Abbildungen zeigen:

20

Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Modulationsmöglichkeiten der löslichen Guanylylcyclase (sGC- $\alpha$ 1/sGC- $\beta$ 1). Die normale Aktivierung erfolgt über NO-Synthase (NOS) und NO (Stickstoffmonoxid). NO reagiert aber mit Sauerstoffradikalen u.a. zu Peroxynitrit (ONOO $\cdot$ ), das zytotoxisch ist und sGC nur schwach aktiviert. NO kann zusätzlich über NO-Donoren wie Glycerolnitrat oder Natriumnitroprussid freigesetzt werden. Durch sGC-Modulatoren (z.B. YC-1), kann sGC direkt aktiviert werden oder aber der Aktivierungseffekt von NO auf sGC wird durch diese Modulatoren verstärkt. Durch Gentransfer (z.B. mittels adenoviraler Vektoren) läßt sich zusätzlich eine Überexpression der sGC erreichen, bzw. ein pathologisch bedingt zu geringer Expressionsspiegel ausgleichen. Es könnten auch adenovirale (oder andere) Vektoren mit sGC-Mutanten eingesetzt werden, die eine

25

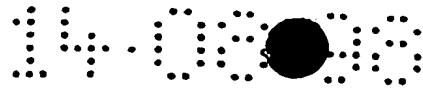
30

höhere Basalaktivität zeigen. Dadurch ließe sich unabhängig von NOS, NO, NO-Donoren oder sGC-Modulatoren dauerhaft ein erhöhter cGMP-Spiegel erreichen.

Abbildung 2 zeigt einen schematischen Vergleich der sGC $\alpha$ 1-Untereinheit von Rind bzw. Ratte mit der veröffentlichten Sequenz des als „sGC $\alpha$ 3“ bezeichneten humanen cDNA-Klons (Giuli et al., 1992). Die Balken stellen dabei das Protein dar. Dabei bezeichnet „N“ den N-Terminus, „C“ den C-Terminus. Markiert sind mit verschiedenen Schraffuren die funktionellen Abschnitte „regulatorische Domäne“, „sGC-Homologiedomäne“ und „Cyclasedomäne“ dieser Proteine. Schwarz markiert sind die beiden Bereiche „S1“ und „S2“, für die sich keine homologen Bereiche in den Proteinen der sGC $\alpha$ 1 von Rind und Ratte finden.

Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des humanen sGC $\alpha$ 3-Klons mit den veröffentlichten Sequenzierfehlern (Giuli et al., 1992). Oben ist die cDNA gezeigt: Der Balken stellt den kodierenden Bereich der cDNA dar, die Striche links und rechts davon zeigen die untranslatierten Bereiche am 5'- und 3'-Ende. S1 und S2 stellen die Bereiche fehlender Homologie zu den Isoformen sGC $\alpha$ 1 von Rind und Ratte dar (vgl. Abb. 2). Darunter sind die Positionen der Sequenzierfehler eingezeichnet: Zeile a zeigt die Nukleotidinsertionen, Zeile b die Deletionen und Zeile c die Austausche. Darunter ist ein Maßstab in Basenpaaren (bp) gezeigt. Ganz unten sind für jede der drei Zeilen a, b und c die Sequenzierfehler aufgeführt: Der Buchstabe gibt dabei die Art der betroffenen Base an, die Zahl ihre Position in der cDNA.

Abbildung 4 zeigt den Nachweis der Expression von humaner sGC $\alpha$ 1 (A) und sGC $\beta$ 1 (B) in humanen Geweben mittel PCR in cDNA-Banken. Abgebildet ist ein Foto eines ethidiumbromidgefärbten Agarosegels mit aufgetrennten PCR-Produkten unter UV-Licht. Der Pfeil links zeigt das spezifische Produkt an. Ganz unten in den Fotos sind außerdem die PCR-Primer zu sehen. Oben ist jeweils das Gewebe angegeben, aus dem die cDNA-Bank hergestellt wurde. Bei der Negativkontrolle



wurde keine cDNA zugegeben, bei der Positivkontrolle wurde Plasmid mit der cDNA der hsGC $\alpha$ 1 zugegeben.

Abbildungen 5 und 6 zeigen die Baculovirus-Transfervektoren pVL1393 bzw. pAcG2T (jeweils ohne die hsGC-cDNA), die für die Konstruktion der rekombinanten Baculoviren zur Expression der humanen sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 in Sf9-Zellen verwendet wurden. Oben ist jeweils das ringförmige Plasmid mit den Restriktionsschnittstellen (Kurzname und Position in Basenpaaren), dem Gen für Ampicillin-Resistenz (Amp<sup>R</sup>), dem „origin of replication“ (ColE ori), dem Polyhedrinpromotor, der Glutathion-S-Transferase-Sequenz (nur Abb. 6) und der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) dargestellt. Abbildung 5 zeigt unten die Multiple Klonierungsstelle mit den Restriktionsschnittstellen, die nur einmal im Plasmid vorkommen. Abbildung 6 zeigt unten die Multiple Klonierungsstelle mit den Restriktionsschnittstellen, die nur einmal im Plasmid vorkommen, sowie einer Thrombinschnittstelle.

Abbildung 7 zeigt die Konstruktion des Plasmids hsGC $\beta$ 1-pVL1393 (ohne GST-Tag) mit der hsGC $\beta$ 1-cDNA, das benutzt wurde, um durch homologe Rekombination den gentechnisch veränderten, hsGC $\beta$ 1-exprimierenden Baculovirus zu erhalten. Die Vorgehensweise für das Plasmid pAcG2T-hsGC $\beta$ 1 (mit GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus *Schistosoma japonicum*) ist identisch. Mittels einer PCR wurde mit den Primern A (Basen 89-116 der hsGC $\beta$ 1-cDNA + BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende) und B (Basen 692-711 der hsGC $\beta$ 1-cDNA [Gegenstrang] mit natürlicher Schnittstelle KpnI) ein Fragment hergestellt, das an seinem 5'-Ende zusätzlich eine BamHI-Schnittstelle trägt. Durch diese zusätzliche Schnittstelle konnte Fragment 1 (PCR-Fragment mit neuer BamHI-Schnittstelle) und Fragment 2 (hsGC $\beta$ 1-cDNA von Schnittstelle KpnI bis Schnittstelle EcoRI) zusammen in die Schnittstellen BamHI und EcoRI des Plasmids pVL1393 inseriert werden, wodurch eine komplette hsGC $\beta$ 1-cDNA unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors (PHP) zu liegen kommt.

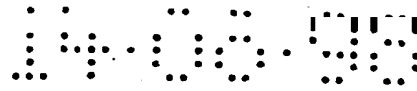


Abbildung 8 zeigt die Konstruktion des Plasmids hsGC $\alpha$ 1-pVL1393 (ohne GST-Tag) mit der hsGC $\alpha$ 1-cDNA, das benutzt wurde, um durch homologe Rekombination den gentechnisch veränderten, hsGC $\alpha$ 1-exprimierenden Baculovirus zu erhalten.

- 5 Die Vorgehensweise für das Plasmid pAcG2T-hsGC $\alpha$ 1 (mit GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus *Schistosoma japonicum*) ist identisch. Mittels einer PCR wurde mit den Primern C (Basen 524-541 der hsGC $\alpha$ 1-cDNA + BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende) und D (Basen 1232-1249 der hsGC $\alpha$ 1-cDNA [Gegenstrang]) ein Fragment hergestellt, das an seinem 5'-Ende zusätzlich eine BamHI-Schnittstelle und das in
- 10 dem Fragment eine natürliche BsaAI-Schnittstelle trägt. Durch diese zusätzliche Schnittstelle konnte das BsaAI-gespaltene Fragment 3 (PCR-Fragment mit neuer BamHI-Schnittstelle bis BsaAI) und Fragment 4 (hsGC $\alpha$ 1-cDNA von Schnittstelle BsaAI bis Schnittstelle EcoRI) zusammen in die Schnittstellen BamHI und EcoRI des Plasmids pVL1393 inseriert werden, wodurch eine komplette hsGC $\alpha$ 1-cDNA unter
- 15 der Kontrolle des Polyhedrinpromotors (PHP) zu liegen kommt.

- Abbildung 9 zeigt den Nachweis der Expression von hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 in Sf9-Zellen, die mit den oben beschriebenen gentechnisch veränderten Viren (mit hsGC $\alpha$ 1- oder hsGC $\beta$ 1 -cDNA; beide ohne GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus
- 20 *Schistosoma japonicum*) infiziert wurden. Links (A) ist ein Coomassie-gefärbtes 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel gezeigt, auf dem durch Zentrifugation (20.000 x g) in Pellet (P) und Überstand (S) aufgetrenntes Zellhomogenat aufgetragen wurde. „Co“ bezeichnet dabei die Kontrolle mit uninfizierten Sf9-Zellen. „ $\alpha$ 1“ bezeichnet Sf9-Zellen, die mit Viren mit der hsGC $\alpha$ 1-cDNA infiziert wurden, während „ $\beta$ 1“ Sf9-
- 25 Zellen bezeichnet, die mit Viren mit der hsGC $\beta$ 1-cDNA infiziert wurden. Die Position der hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 im Gel ist jeweils gekennzeichnet ( $\alpha$ 1 bzw  $\beta$ 1). Rechts davon ist ein Immunoblot mit Überstand (S) und Pellet (P) des Zellhomogenates von Sf9-Zellen gezeigt, die entweder uninfiziert (Co) oder mit hsGC $\alpha$ 1- und hsGC $\beta$ 1-Baculovirus koinfiziert wurden ( $\alpha$ 1+ $\beta$ 1). Im Immunoblot
- 30 wurden zuerst die oben beschriebenen Peptidantikörpern gegen hsGC $\beta$ 1 (anti-

hsGC $\beta$ 1) eingesetzt (Abb. 9B, Spuren 1-4). Anschließend wurde der Blot nochmals mit den Peptidantikörpern gegen hsGC $\alpha$ 1 (anti-hsGC $\alpha$ 1) entwickelt (Abb. 9B, Spuren 5-8), wodurch hier auch die hsGC $\beta$ 1-Banden sichtbar sind.

5 Abbildung 10 zeigt den Nachweis der Guanylylcyclase-Aktivität (Bildung von cGMP aus GTP) in intakten Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGC $\alpha$ 1- und hsGC $\beta$ 1-cDNA (beide ohne GST-Tag) koinfiziert wurden. Gezeigt ist jeweils der Gehalt an cGMP in pmol pro 10<sup>6</sup> Zellen bei unterschiedlicher Behandlung mit Pharmaka: Unten sind jeweils die zugesetzten Pharmaka angegeben. Probe 1 ist in beiden Teilgrafiken A und B unbehandelt. Bei 10 den übrigen Proben wurde jeweils 1 mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) zugesetzt (oberste Zeile: schwarzer Querbalken). In der mittleren Zeile ist die in der jeweiligen Probe zugesetzte Menge an SNP in  $\mu$ M angegeben. Die unterste Zeile zeigt die Menge an zugesetztem YC-1 (A, links) oder ODQ (B, rechts) in  $\mu$ M.

15 YC-1 = 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol;  
ODQ = 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]chinoxalin-1-on;  
SNP = Nitroprussidnatrium;  
cGMP = zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat

20 Abbildung 11 zeigt den Nachweis der Guanylylcyclase-Aktivität (Bildung von cGMP aus GTP) im Homogenat von Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGC $\alpha$ 1- und hsGC $\beta$ 1-cDNA (beide ohne GST-Tag) koinfiziert wurden. Oben (A) ist die lösliche Zellfraktion (Überstand nach Zentrifugation bei 20000 x g) eingesetzt worden, unten (B) das zugehörige Pellet. 25 Gezeigt ist jeweils die Menge an gebildetem cGMP in pmol pro mg Protein und pro Minute in Homogenat von Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten (Angaben in Stunden) nach der Infektion mit den Baculoviren geerntet wurden. Dabei wurde die cGMP-Bildung mit (schwarze Kästchen) und ohne (weiße Kästchen) Zusatz von 100  $\mu$ M SNP gemessen.

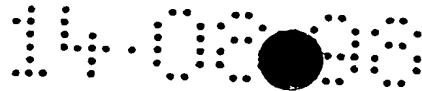
Abbildung 12 zeigt den Nachweis der Guanylylcyclase-Aktivität (Bildung von cGMP aus GTP) in Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGC $\beta$ 1-cDNA (ohne GST-Tag) und hsGC $\alpha$ 1-cDNA (mit GST-Tag = Glutathion-S-Transferase-cDNA aus *Schistosoma japonicum*) koinfiziert wurden. Gezeigt ist die Bildung von cGMP in pmol pro mg Protein und pro Minute während des Reinigungsprozesses (Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B). Gemessen wurde jeweils im Lysat (nach Abzentrifugieren des unlöslichen Anteils bei 20000 x g), der Überstand nach Bindung der hsGC an die Glutathion-Sepharose 4B (Durchfluß), die beiden Überstände vom Waschen der hsGC-gebundenen Glutathion-Sepharose 4B (1. und 2. Wasch) sowie der Überstand nach Elution der hsGC mit reduziertem Glutathion (1. und 2. Elution). Unterschieden wurde dabei die cGMP-Bildung ohne (schwarze Kästchen, „basal“) und mit (graue Kästchen, „+100  $\mu$ M SNP“) Zusatz von 100  $\mu$ M SNP.

Abbildung 13 zeigt den Nachweis der natürlichen Expression von hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 in verschiedenen humanen Geweben im Immunoblot.

Links (A) wurden die oben beschriebenen Peptidantikörper gegen hsGC $\alpha$ 1 (anti-hsGC $\alpha$ 1) eingesetzt, rechts (B) die Peptidantikörper gegen hsGC $\beta$ 1 (anti-hsGC $\beta$ 1).

Dabei wurde als Neaktivkontrolle jeweils in der rechten Hälfte das Peptid zugesetzt, gegen das die Antikörper gerichtet sind (Peptid: +), während in der jeweils linken Hälfte kein Peptid zugegeben wurde (Peptid: -). Auf ein 8 %iges Polyacrylamidgel wurden jeweils SDS-Extrakte von rhsGC  $\alpha$ 1- (in Teilabb. A) oder rhsGC $\beta$ 1-überexprimierenden Sf9-Zellen (in Teilabb. B) (Sf9), von humanem Großhirncortex (Cortex), von humanem Cerebellum (Cerebellum) und von humaner Lunge (Lunge) aufgetragen. Die spezifischen Banden von hsGC $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1) und hsGC $\beta$ 1 ( $\beta$ 1) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Abbildung 14 zeigt im Immunoblot den Nachweis der Aufreinigung von hsGC $\alpha$ 1 (als hsGC $\alpha$ 1/hsGC $\beta$ 1-Dimere) aus Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGC $\alpha$ 1-cDNA mit GST-Tag (=



Glutathion-S-Transferase-cDNA aus *Schistosoma japonicum*) und hsGCβ1-cDNA (ohne GST-Tag) koinfiziert wurden. Zellysat wurde mit Glutathion-Sepharose 4B inkubiert, und der Überstand nach der Bindung aufgetragen (Überstand nach Bindung). Die Sepharose wurde zweimal gewaschen, und jeweils der Überstand dieses Waschpuffers aufgetragen (1. und 2. Waschschrift). Dann wurde eluiert durch Abspalten des hsGCα1-Proteins vom GST-Tag mit Thrombin und ein Aliquot des Überstandes aufgetragen ("Elution mit Thrombin"). Danach wurde die Glutathion-Sepharose 4B in SDS-Stoppuffer aufgenommen und ein Aliquot aufgetragen (GSH-Sepharose nach Elution). Zusätzlich wurde Glutathion-Sepharose 4B mit gebundenem hsGCα1 ohne vorherige Thrombin-Elution in SDS-Stoppuffer aufgenommen und ein Aliquot aufgetragen (GSH-Sepharose vor Elution). Der Immunoblot wurde mit den hier beschriebenen affinitätsgereinigten Peptidantikörpern gegen den C-Terminus der hsGCα1 entwickelt. Die Pfeile rechts zeigen die spezifischen Banden von hsGCα1 mit dem anhängenden GST-Tag (GST-hsGCα1) und hsGCα1 ohne GST-Tag (hsGCα1).

Abbildung 15 zeigt im Coomassie-Brilliant-Blue-R250-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel den Nachweis der Aufreinigung von hsGCα1/β1 aus Sf9-Zellen, die mit den hier beschriebenen rekombinanten Baculoviren mit hsGCα1-cDNA mit GST-Tag (= Glutathion-S-Transferase-cDNA aus *Schistosoma japonicum*) und hsGCβ1-cDNA ohne GST-Tag koinfiziert wurden. Zellysat dieser infizierten Sf9-Zellen (Lysat) wurde mit Glutathion-Sepharose 4B inkubiert, und der Überstand nach der Bindung aufgetragen (Überstand nach Bindung). Die Glutathion-Sepharose 4B wurde zweimal gewaschen, und jeweils der Überstand des Waschpuffers aufgetragen (1. und 2. Wasch). In einer Probe wurde das gebundene GST-hsGCα1/β1 durch Inkubation mit reduziertem Glutathion eluiert und aufgetragen (Elution mit Glutathion). Bei den anderen Proben wurde die Glutathionsepharose mit dem Puffer für die Thrombinspaltung - ohne Thrombin - gewaschen und der Überstand dieses Puffers aufgetragen (3. Wasch). Dann wurde das hsGCα1/β1-Dimer eluiert durch Inkubation mit verschiedenen Mengen Thrombin und die

Eluate aufgetragen (Elution mit X E/ml Thrombin) [E = Einheiten]. Verwendet wurden jeweils gleiche relative Mengen jeder Probe. Rechts sind die bei den verschiedenen Elutionsmethoden sichtbaren Banden gekennzeichnet: GST-hsGC $\alpha$ 1 = hsGC $\alpha$ 1 mit GST-Tag; hsGC $\alpha$ 1=hsGC $\alpha$ 1 ohne GST-Tag; hsGC $\beta$ 1= hsGC $\beta$ 1 ohne GST-Tag. Links sind Molekulargewichtsstandards auf das Gel aufgetragen, deren Größe ganz links in kDa angegeben ist.

Abbildung 16 zeigt die Konstruktion der rekombinanten adenoviralen hsGC-Vektoren. Die cDNAs für die hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 (graue Balken) wurden in das adenovirale Transferplasmid pZS2 inseriert, das eine Deletion in der Adenovirus-E1-Region ( $\Delta$ E1) enthält und eine in diesem Plasmid einmaligen XbaI-Schnittstelle. Dies ergab die Plasmide hsGC $\alpha$ 1-pZS2 bzw. hsGC $\beta$ 1-pZS2. Mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnittenes hsGC $\alpha$ 1-pZS2 und hsGC $\beta$ 1-pZS2 (mittlerer Balken, dargestellt als "sGCpZS2") wurde in die XbaI-Schnittstelle des langen Armes (oberer Balken, "RR5") von Ad5 ligiert. Dies ergab die Adenovektoren Ad5CMVhsGC $\alpha$ 1 bzw. Ad5CMVhsGC $\beta$ 1 (unterer Balken, "Ad 5 CMV sGC"), in dem die sGC-cDNAs unter der Kontrolle des CMV-Promotors und -Enhancers liegen (CMV = Cytomegalovirus).

Abbildung 17 zeigt die Stimulierbarkeit der sGC-Aktivität durch 100  $\mu$ M SNP (Natriumnitroprussid) in EA.hy926-Zellen, die mit den beiden hsGC-Adenoviren Ad5CMVhsGC $\alpha$ 1 und Ad5CMVhsGC $\beta$ 1 koinfiziert worden waren (Proben A - C) und bei uninfizierten EA.hy926-Zellen (Ansatz D). Auf der Y-Achse ist die Bildung von pmol cGMP pro mg Protein und pro Minute aufgetragen. Die dunklen Balken zeigen die basale cGMP-Bildung ohne SNP-Stimulierung, die hellen Balken stellen die cGMP-Bildung nach SNP-Stimulierung dar.

Abbildung 18 zeigt die DNA-Sequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha$ 1 (hsGC $\alpha$ 1); SEQ ID NO: 1.



Abbildung 19 zeigt die Aminosäuresequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha 1$  (hsGC $\alpha 1$ ); SEQ ID NO: 2.

Abbildung 20 zeigt die DNA-Sequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\beta 1$  (hsGC $\beta 1$ ); SEQ ID NO: 3.

Abbildung 21 zeigt die Aminosäuresequenz der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\beta 1$  (hsGC $\beta 1$ ); SEQ ID NO: 4.

Abbildung 22 zeigt die Aminosäuresequenz des Peptids, das zur Herstellung von Antikörpern gegen die humane lösliche Guanylylcyclase  $\alpha 1$  (hsGC $\alpha 1$ ) verwendet wurde (entspricht Aminosäuren 634-647 der hsGC $\alpha 1$ ); SEQ ID NO: 5.

Abbildung 23 zeigt die Aminosäuresequenz des Peptides, das zur Herstellung von Antikörpern gegen die humane lösliche Guanylylcyclase  $\beta 1$  (hsGC $\beta 1$ ) verwendet wurde (entspricht Aminosäuren 593-614 der hsGC $\beta 1$ ); SEQ ID NO: 6.

Abbildung 24 zeigt die DNA-Sequenz des PCR-Primerpaares für die humane lösliche Guanylylcyclase  $\alpha 1$  (hsGC $\alpha 1$ ). Oberer Primer (entspricht Nukleotide 524-541 der hsGC $\alpha 1$ -cDNA-Sequenz mit angehängter Restriktionsschnittstelle für BamHI); SEQ ID NO: 7. Unterer Primer (entspricht 1249-1232 der hsGC $\alpha 1$ -cDNA-Sequenz [Gegenstrang]); SEQ ID NO: 8.

Abbildung 25 zeigt die DNA-Sequenz des PCR-Primerpaares für die humane lösliche Guanylylcyclase  $\beta 1$  (hsGC $\beta 1$ ). Oberer Primer (entspricht Nukleotide 89-106 der hsGC $\beta 1$ -cDNA-Sequenz mit angehängter Restriktionsschnittstelle für BamHI); SEQ ID NO: 9. Unterer Primer (entspricht Nukleotide 692-711 der hsGC $\beta 1$ -cDNA-Sequenz [Gegenstrang]); SEQ ID NO: 10.

Vorteile der Erfindung und die Lösung der oben angeführten technischen Probleme durch diese Erfindung

1.) Die in der Literatur als sGC $\alpha$ 3 und sGC $\beta$ 3 beschriebenen cDNA-Klone wurden  
5 als humane Homologe der sGC $\alpha$ 1 und sGC $\beta$ 1 aus Rind und Ratte identifiziert, und  
werden nachfolgend als humane sGC  $\alpha$ 1 (hsGC $\alpha$ 1) und humane sGC  $\beta$ 1 (hsGC $\beta$ 1)  
bezeichnet. Diese sGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1-Isoform ist nach dem aktuellen Wissensstand wegen  
ihrer Funktion im kardiovaskulären System als die pharmakologisch wichtigere  
anzusehen. Da der Originalklon von hsGC $\alpha$ 3 untersucht wurde, konnte gezeigt  
10 werden, daß nicht hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\alpha$ 3 parallel existieren, sondern nur die Form  
hsGC $\alpha$ 1. Damit ist ein eindeutiges Zielprotein für ein pharmakologisches  
Massenscreening und die Gentherapie identifiziert.

2.) Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird erstmals die funktionell aktive  
15 Expression humaner sGC erreicht. Damit ist erstmals das zugehörige Protein durch  
gentechnische Methoden herstellbar.

3.) Mit den erfindungsgemäßen gegen das Protein sGC gerichteten  
Peptidantikörpern ist ein Nachweis der Expression in humanen Geweben, sowie die  
20 Diagnostik von Dysfunktionen (zu hohe/niedrige oder fehlende sGC-Expression)  
möglich. Außerdem stellt die Erfindung die technischen Voraussetzungen bereit, die  
zur weiteren Aufklärung der Transkriptions- und Translationskontrolle von hsGC  
nötig sind. Die erfindungsgemäßen Peptidantikörper haben den Vorteil, daß sie  
monospezifisch sind, gegen die humanen Sequenzen gerichtet sind und außerdem  
25 ihre Eignung für den Immunoblot mit humanen Geweben nachgewiesen worden ist.  
Andere Peptidantikörper zeigen diese Eigenschaften nur zum Teil: Harteneck et al.  
und Guthmann et al. verwenden eine Peptidsequenz (VYKVETVGDKYMTVSGLP),  
die in Guanylylcyclasen recht hohe Konservierung zeigen, so daß eine  
Kreuzreaktion auch mit partikulären Guanylylcyclasen (z.B. GC-C) erwartet  
30 werden kann. Guthmann et al. verwendet außerdem eine zu hsGC $\beta$ 1 identische  
Peptidsequenz (YGPEVWEDIKKEA) und eine bis auf zwei Aminosäureaustausche

identische Peptidsequenz zu hsGC $\alpha$ 1 (KKDVEEANANFLGKASGID). Allerdings ist die Funktion dieser Antikörper im Immunoblot nur für *angereinigte* hsGC aus humanen Thrombozyten gezeigt worden. Zusätzlich erkannten diese Antikörper gegen hsGC $\alpha$ 1 noch ein zweites, unspezifisches Produkt. Humbert et al. und Koesling et al. verwendeten eine Peptidsequenz (SRKNTGTEETE QDEN) aus Rinder-sGC $\beta$ 1, die teilweise (Aminosäuren 1-10) mit dem hier verwendeten Peptid (Aminosäuren 13-22) für hsGC $\beta$ 1 identisch ist, dessen C-Terminus (Aminosäuren 11-15) jedoch deutlich verschieden von der humanen Sequenz ist. Das Antiserum gegen dieses Peptid wurde jedoch nicht an humanem Protein getestet, sondern nur für die Immunpräzipitation der bovinen sGC verwendet.

Zusätzlich zu den in Abbildung 22 und 23 dargestellten Peptiden und deren immunogenen Fragmenten zur Herstellung der erfindungsgemäßen Antikörpern gegen hsGC $\alpha$ 1 oder hsGC $\beta$ 1 in Kanninchen ist auch die Herstellung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen das ganze hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1-Protein oder seine Spaltprodukte möglich. Dabei können verschiedene Tierarten (vorzugsweise Maus, Ratte, Kaninchen) zur Antikörperherstellung eingesetzt werden.

4.) Durch die erfindungsgemäße Expression im eukaryontischen Baculovirus/Sf9-System kann die humane *Isliche* Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 in großen Mengen hergestellt werden. Das Anhängen einer Nukleotidsequenz, die für ein für die Affinitätschromatographie geeignetes Polypeptid kodiert (Affinitätstag, z.B. Glutathion-S-Transferase = GST-Tag), mit einer anschließenden Proteaseschnittstelle am N-Terminus der cDNA der  $\alpha$ 1-Untereinheit erlaubt die schnelle und einfache Aufreinigung des koexprimierten, dimeren Proteins durch einen einzigen affinitätschromatografischen Schritt. Das anhängende Affinitätstag wird anschließend durch Proteaseverdau wieder entfernt, wodurch hinsichtlich der Primärstruktur ein dem nativen identisches Protein erhalten wird. Durch diese revolutionär schnelle und saubere Gewinnung großer, hochreiner Mengen an

funktioneller humaner sGC ergeben sich neue Möglichkeiten für ein Massenscreening nach spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren sowie für die pharmakologische Charakterisierung der potentiellen Arzneistoffe.

- 5 Eine Aufreinigung von hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 kann auch erfolgen durch Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration, Immunaффinitäts-Chromatographie und andere chromatographische Verfahren, z.B. an ATP- , GTP- , cGMP- oder Blue-Sepharose, und anderen derartigen Chromatographiemedien.

- 10 5.) Das erfindungsgemäße Verfahren ist in identischer Weise für andere Isoformen des Enzyms bei Mensch, Ratte und Rind einsetzbar. In dem erfindungsgemäßen Verfahren können verschiedene Affinitäts-tagstags (z.B. Histidin-Oligomer) und verschiedene Expressionssysteme wie z.B. E. coli eingesetzt werden. Andere Bereiche aus der hsGC $\alpha$ 1- und hsGC $\beta$ 1-Sequenz können ebenfalls zur Herstellung  
15 von Antikörpern gegen Peptide oder das ganze Protein verwendet werden.

- 6.) Für die moderne Pharmakaentwicklung ist die Verfügbarkeit großer Mengen eines isolierten humanen Proteins in hoher Reinheit und von hoher Qualität essentiell. Diese Voraussetzung war für die Suche nach Alternativen zu den  
20 klassischen NO-Donoren bisher nicht gegeben. Ein Massenscreening nach spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren ist im Tierversuch zu teuer und wegen Speziesunterschieden, möglichen Nebenwirkungen und Effekten auf andere Isoformen nicht sinnvoll. Zellkultursysteme haben den Nachteil, daß nur mit erheblichem Mehraufwand festgestellt werden kann, wo Substanzen innerhalb der  
25 Signalkaskaden ihre Wirkungen entfalten. Außerdem ist die Zellkultur kostenintensiv und empfindlich. Die Aufreinigung eines Proteins aus tierischen Geweben ist, im Vergleich zur Expression eines Proteins mit rekombinanter DNA-Technologie, aufwendiger bei geringerer Ausbeute. Vor allem aber sind die  
30 Ergebnisse eines Pharmakascreenings aufgrund der Speziesunterschiede nur bedingt übertragbar. Die rekombinante hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 dagegen ist durch die erfindungsgemäßen Verfahren in großen Mengen kostengünstig verfügbar und

liefert im Screening eindeutige Aussagen über Modulation, Aktivierung oder Inhibition dieses speziellen humanen Enzyms. Speziesunterschiede und mangelnde Übertragbarkeit auf den Menschen sind durch Verwendung eines humanen Enzyms a priori ausgeschlossen.

5

Weiterhin steht so für Kristallisation und Strukturaufklärung hsGC in großen Mengen und ausreichender Reinheit zur Verfügung. Hierdurch ist eine wichtige Voraussetzung für ein rationelles Pharmako-Design mittels Molecular Modelling erfüllt.

10

7.) Zusätzlich zur Verwendung der isolierten hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 können intakte Sf9-Zellen, die durch Infektion mit den hier beschriebenen rekombinanten Baculoviren hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 exprimieren, für in-vitro-Versuche eingesetzt werden.

15

8.) Durch Gentransfer läßt sich eine vorübergehende (z.B. mit adenoviralen Vektoren) oder dauerhafte Überexpression erreichen, wodurch der cGMP-Spiegel auch bei geringer NO-Konzentration oder schlechterer Aktivierung der sGC durch Peroxynitrit-Bildung erhöht werden kann. Dieser Ansatz bietet außerdem konzeptionelle Vorteile gegenüber einem Gentransfer von NOS (NO-Synthase), da mit dem erfindungsgemäßen Ansatz die Bildung von zytotoxischem, und bezüglich der Aktivierung von sGC weniger effektivem Peroxynitrit umgangen wird.

20

Außerdem ließe sich (z.B. für therapeutische Zwecke) durch Gentransfer von sGC-Mutanten mit erhöhter Basalaktivität unabhängig von NOS, NO, NO-Donoren oder sGC-Modulatoren eine dauerhafte Erhöhung des cGMP-Spiegels erreichen.

25

9.) Zusätzlich zu dem beschriebenen Reinigungsverfahren für hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 ist eine Aufreinigung aus Sf9-Zellen nach Infektion mit den beschriebenen Baculoviren mit hsGC $\alpha$ 1- oder hsGC $\beta$ 1-cDNA auch möglich, wenn mit hsGC $\alpha$ 1-Baculoviren ohne GST-Tag (GST-Tag = angehängte Glutathion-S-Transferase-Sequenz aus *Schistosoma japonicum*) und hsGC $\beta$ 1-Baculoviren mit GST-Tag koinfiziert wird, sowie bei

30

Koinfektion von hsGC $\alpha$ 1-Baculoviren mit GST-Tag und hsGC $\beta$ 1-Baculoviren mit GST-Tag.

Außerdem ist zusätzlich zum Einsatz von loser Glutathion-Sepharose 4B auch die  
5 Verwendung einer Säule mit Glutathion-Sepharose 4B möglich.

Eine Aufreinigung kann auch erfolgen, indem *nach* einer Elution des dimeren Fusionsproteins GST-hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 mittels reduziertem Glutathion von der Glutathion-Sepharose 4B dieses Fusionsprotein mit Thrombin verdaut wird. Nach  
10 Dialyse (zur Entfernung des reduzierten Glutathions) kann dann das abgespaltene GST-Tag durch erneute Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B aus dem Gemisch entfernt werden.

10.) Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch für die humane lösliche  
15 Guanylylcyclase  $\alpha$ 2 (GenBank: x63282) und ein eventuell existierendes humanes Homolog zur löslichen Guanylylcyclase  $\beta$ 2 (aus Ratte; GenBank: m57507), sowie für andere humane lösliche Guanylylcyclasen angewendet werden (in allen hier aufgeführten technischen Varianten).

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

### Beispiel 1

#### Die korrigierte Sequenz von *hsGCα1* und *hsGCβ1*

5

10

15

20

Die Originalklone der humanen Isoformen *sGCα3* und *sGCβ3* (Giuli et al., 1992) wurden erneut sequenziert. Während die Sequenz des *sGCβ3*-Klones bestätigt wurde (siehe SEQ ID NO: 3 und Abb. 20), ergab die Sequenzierung von *sGCα3*, daß die Originalpublikation (Giuli et al., 1992) 19 Sequenzierfehler enthält, die in einer Übersicht in Abb. 3 zusammengefaßt sind. Die entsprechend korrigierte  $\alpha3$ -cDNA-Sequenz ist in SEQ ID NO: 1 und Abb. 18 dargestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO: 2 und Abb. 19 dargestellt. Die korrigierte Sequenz (siehe SEQ ID NO: 1 und Abb. 18) ist darüberhinaus identisch mit der in der GenBank veröffentlichten humanen *sGCα1*-Sequenz (Accession-Nr. U58855), wobei allerdings der 5'-untranslatierte Bereich der hier vorgestellten Sequenz um 506 Basenpaare länger ist. "*sGCα3*" wird daher jetzt als humane *sGCα1* (*hsGCα1*) klassifiziert. Damit ist gezeigt, daß beim Menschen nicht zwei verschiedene *hsGCα*-Untereinheiten  $\alpha1$  und  $\alpha3$  vorkommen, die für die kardiovaskuläre Forschung von Bedeutung sein könnten, sondern - analog zur Situation bei Rind und Ratte - nur *hsGCα1*.

Tabelle 1 Revidierte Terminologie von löslichen Guanylylcyclase-cDNAs und -proteinen, und ihr Nachweis in humanem Gewebe .

humane sGC-Untereinheiten		
	$\alpha$	$\beta$
Isoform 1	cDNA und Protein nachweisbar aktiv, wenn koexprimiert	cDNA und Protein nachweisbar
Isoform 2	cDNA nachweisbar aktiv, wenn mit boviner $\beta1$ koexprimiert	

Die Expression von sGC $\alpha$ 1- und sGC $\beta$ 1-mRNA in humanen Geweben wurde mittels PCR gezeigt (Abb. 4). Die Amplifikation eines hsGC $\beta$ 1-Fragmentes mit einem PCR-Primerpaar (5'-AAAAGGATCCATGTACGGATTTGTGAAT-3' = Nukleotide 89-106  
 5 der hsGC $\beta$ 1-cDNA-Sequenz mit angehängter Restriktionsschnittstelle; 5'-ATGCGTGATTCCTGGGTACC-3' = 692-711 der hsGC $\beta$ 1-cDNA-Sequenz) bei einer Annealing-Temperatur von 54°C ergab jeweils eine spezifische Bande in cDNA-Banken aus Hirn, Herz, Niere, Lunge, Pankreas und Skelettmuskel. Die Identität des  
 10 amplifizierten Fragmentes wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Amplifikation eines hsGC $\alpha$ 1-Fragmentes mit einem PCR-Primerpaar (5'-AAAAGGATCCATGTTCTGCACGAAGCTC-3' = Nukleotide 524-541 der hsGC $\alpha$ 1-cDNA-Sequenz mit angehängter Restriktionsschnittstelle; 5'-ATTATGGAAGCAGGGAGG-3' = 1249-1232 der hsGC $\alpha$ 1-cDNA-Sequenz) bei einer  
 15 Annealing-Temperatur von 54° C ergab jeweils eine spezifische Bande in cDNA-Banken aus Herz (Abb. 4A) und Lunge (nicht gezeigt). Die Sequenzierung der Fragmente ergab in jedem Fall die korrigierte hsGC $\alpha$ 1-Sequenz; die von Giuli et al. publizierte "sGC $\alpha$ 3"-Sequenz wurde nicht gefunden. Damit wurde gezeigt, daß  
 20 beim Menschen nur eine hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 vorhanden ist, während die mutmaßliche hsGC $\alpha$ 3/ $\beta$ 3 lediglich auf Sequenzierfehlern beruht. Dadurch ergibt sich für die kardiovaskuläre Forschung ein klares Bild bezüglich der sGC-Isoform, die im Targetprotein für das Pharmaka-Screening ist.

25

### Beispiel 2

*Konstruktion von rekombinanten Baculoviren für die Expression humaner sGC $\alpha$  und sGC $\beta$  in Insektenzellen*

Zum Nachweis, daß hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 funktionelles, heterodimeres sGC-Protein  
 30 konstituieren können, wurden die beiden cDNAs in Baculovirus eingebracht, mit



dessen Hilfe ein rekombinantes Protein unter der Kontrolle des starken Polyhedrinpromotors in Insektenzellen (Sf9-Zellen) exprimiert wurde. Zur Herstellung der rekombinanten Baculoviren wurde der Baculovirus-Transfervektor pVL1393 (Fa. Pharmingen, San Diego, California, USA; Abb. 5) bzw. der  
5 Baculovirus-Transfervektor pAcG2T (mit Glutathion-S-Transferase-Sequenz aus *Schistosoma japonicum* und Thrombinschnittstelle; Fa. Pharmingen; Abb. 6) verwendet, in den die Fremdgene (hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1) kloniert wurden. Die Kotransfektion eines solchen rekombinanten pVL1393- oder pAcG2T-Plasmids mit BaculoGold Baculovirus-DNA (Pharmingen) erlaubte die direkte Isolation der durch  
10 homologe Rekombination entstandenen gentechnisch veränderten Baculoviren mit hsGC $\alpha$ 1- oder hsGC $\beta$ 1-cDNA aus dem Zellkulturmedium.

Die Konstruktion von pVL1393-hsGC $\beta$ 1 ist in Abb. 7 schematisch dargestellt (identische Vorgehensweise für pAcG2T-hsGC $\beta$ 1). Es wurde der kodierende Bereich  
15 der hsGC $\beta$ 1 cDNA mit der 3'-untranslatierten Region, jedoch ohne die 5'-untranslatierte Region, in pVL1393 kloniert. Dazu wurde mittels PCR mit den Primern A und B eine BamHI-Schnittstelle unmittelbar in 5'-Richtung des für das Start-Methionin codierenden Codons eingeführt. Das so amplifizierte Fragment 1 wurde mit BamHI/KpnI verdaut; Fragment 2 wurde mit KpnI/EcoRI aus dem  
20 sGC $\beta$ 1-cDNA-Klon isoliert. Die Fragmente 1 und 2 sowie der BamHI/EcoRI-geöffnete Vektor wurden ligiert (siehe Abb. 7).

Die Konstruktion von pVL1393-hsGC $\alpha$ 1 ist in Abb. 8 schematisch dargestellt (identische Vorgehensweise für pAcG2T-hsGC $\alpha$ 1). Es wurde der kodierende Bereich  
25 der hsGC $\alpha$ 1 cDNA mit der 3'-untranslatierten Region, jedoch ohne die 5'-untranslatierte Region, in pVL1393 kloniert. Dazu wurde mittels PCR mit den Primern C und D eine BamHI-Schnittstelle unmittelbar in 5'-Richtung des für das Start-Methionin codierenden Codons eingeführt. Das so amplifizierte Fragment 3 wurde mit BamHI/BsaAI verdaut; Fragment 4 wurde mit BsaAI/EcoRI aus dem

sGC $\alpha$ 1-cDNA-Klon isoliert. Die Fragmente 3 und 4 sowie der BamHI/EcoRI-geöffnete Vektor wurden ligiert (siehe Abb. 8).

Zur Herstellung der rekombinanten hsGC $\alpha$ 1- und hsGC $\beta$ 1-Baculoviren wurde jeweils der Baculovirus-Transfervektor (pVL1393-hsGC $\alpha$ 1, pAcG2T-hsGC $\alpha$ 1, pVL1393-hsGC $\beta$ 1, pAcG2T-hsGC $\beta$ 1) mit Baculovirus-DNA (Baculo-Gold; Fa. Pharmingen, San Diego, California, USA) in Sf9-Monolayer-Zellkulturen kotransfiziert. Die Zellen wurden dazu bei 27°C in IPL-41-Medium (Gibco) kultiviert, das mit 10 % (Vol/Vol) fötalem Kälberserum (Biochrom), 4 % (Vol/Vol) Tryptose-Phosphat-Broth (Gibco), 1 % (Vol/Vol) Pluronic F68 (Gibco), 0,5 % Amphotericin B (Gibco), 80 µg/ml Gentamycinsulfat (Gibco) und 0,5 mM  $\delta$ -Aminolävulinsäure (Merck) suppleментиiert war. Rekombinante hsGC $\alpha$ 1- und hsGC $\beta$ 1-Baculovirenklone wurden mittels Plaque-Reinigung aus dem Kulturmedium gewonnen. Zur Herstellung von Virusstammlösungen mit hohem Titer wurden Sf9-Schüttelkulturen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml) mit einer M.O.I. (multiplicity of infection) von 0,1 pfu/Zelle (pfu = Plaque-bildende Einheiten) infiziert und 6 Tage nach der Infektion geerntet.

### Beispiel 3

#### *Produktion von rekombinanter hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 in Sf9-Zellen*

Jeweils 10 rekombinante hsGC $\alpha$ 1- und hsGC $\beta$ 1-Baculovirenklone wurden bezüglich der Expression von rekombinantem Protein in Sf9-Zellen getestet. Dazu wurden Sf9-Monolayer-Zellkulturen mit plaquegereinigtem, rekombinatem hsGC $\alpha$ 1- oder hsGC $\beta$ 1-Baculovirus infiziert, 5 Tage bei 27°C kultiviert, mit einem Gummischaber geerntet, in 0,5 ml Lysispuffer (25 mM TEA, pH 7,8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 µM Leupeptin, 0,5 mg/l Trypsininhibitor) resuspendiert und mit Ultraschall homogenisiert ("Sonifier 250", "Standard"-Spitze, Branson; 15-mal, "duty cycle": 15 %, Intensität: 1). Nach Zentrifugation der Homogenate bei  $20.000 \times g$

wurden Überstand und Pellet in einer SDS-PAGE analysiert. Drei der hsGC $\beta$ 1-Baculovirenklone und zwei der hsGC $\alpha$ 1-Baculovirenklone lieferten rekombinantes Protein in Mengen, die in der unlöslichen Fraktion durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue R250 sichtbar gemacht werden konnten. Rekombinante humane sGC $\alpha$  und sGC $\beta$  (rhsGC $\alpha$  und rhsGC $\beta$ ) wanderten mit einem apparenten Molekulargewicht von 79,5 (hsGC $\alpha$ 1) bzw. 68,5 kDa (hsGC $\beta$ 1), was den aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz vorhergesagten Molekulargewichten sehr nahe kommt (77,5 bzw. 70,5 kDa) (repräsentative Klone in Abb. 9). Die Baculovirenklone, die im Immunoblot die höchsten Expression von rekombinantem Protein zeigten, wurden für die Expression funktioneller heterodimerer hsGC verwendet [siehe Beispiele 4 bis 7.]

#### Beispiel 4

*Rekombinante humane sGC in intakten Insektenzellen ist aktiv und NO-stimulierbar*

Zur Herstellung funktioneller heterodimerer humaner sGC wurden rhsGC $\alpha$ 1 und rhsGC $\beta$ 1 über die rekombinanten Baculoviren in Sf9-Zellen koexprimiert. Dazu wurden Sf9-Monolayerkulturen [ $2,5 \times 10^6$  Zellen/Petrischale,  $\varnothing$  90 mm; Supplemente siehe Ziffer 2.)] mit einer M.O.I. (multiplicity of infection) von 2 pfu/Zelle für jeden rekombinanten Baculovirus (hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1; beide ohne GST-Tag) koinfiziert und für 48 h bei 27°C kultiviert. Die basale sowie die NO-stimulierbare Aktivität der sGC in den Zellen wurde durch Messung des cGMP-Gehaltes der Zellen in Anwesenheit des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) bestimmt.

Zur Bestimmung des cGMP-Gehaltes wurde das Kulturmedium durch Krebs-Ringer-Puffer (KRB), welcher zusätzlich 1mM IBMX enthielt, ersetzt (119 mM NaCl; 4,74 mM KCl; 2,54 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,19 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 10 mM HEPES, pH 7,4; 0,1% BSA), und die Zellen für eine Stunde bei 27°C

kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem KRB gewaschen und mit einem Gummischaber in 1 ml eiskaltem Ethanol (80 %) geerntet. Die Zellen wurden mit Ultraschall homogenisiert [siehe oben unter Ziffer 3.)] und für 20 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und der Rückstand anschließend in 25 mM TEA, pH 7,8 resuspendiert. Der cGMP-Gehalt wurde im RIA bestimmt (Biotrend).

Die Koexpression von rhsGC $\alpha$ 1 und rhsGC $\beta$ 1 führte zur Bildung funktioneller sGC mit basaler Aktivität in Sf9-Zellen (Abb. 10): Während nicht infizierte Sf9-Zellen etwa 0,1 pmol cGMP/10<sup>6</sup> Zellen enthielten (nicht gezeigt), wurde in rhsGC-exprimierenden Zellen etwa 20 pmol cGMP/10<sup>6</sup> Zellen gefunden (Abb. 10). Diese basale Aktivität rekombinanter hsGC war durch einen NO-Donor, SNP (Natriumnitroprussid), stimulierbar. Wurden die Zellen vor der Ernte für 2 min mit 10, 100 oder 1000  $\mu$ M SNP inkubiert, stieg der cGMP-Gehalt konzentrationsabhängig auf den bis zu 50-fachen Wert an (Abb. 10).

### Beispiel 5

#### *Rekombinante humane sGC in Insektenzellextrakten ist aktiv und NO-stimulierbar*

Die Aktivität der rekombinanten hsGC (nach Expression mit den oben beschriebenen rekombinanten Baculoviren) wurde nicht nur in intakten Sf9-Zellen nachgewiesen, sondern auch in Sf9-Zellextrakten. Zur Herstellung solcher Extrakte wurden Sf9-Schüttelkulturen [2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml; Supplemente siehe Beispiel 2] mit einer M.O.I. (multiplicity of infection) von 1 pfu/Zelle für jedes Virus (hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1; beide ohne GST-Tag) koinfiziert und bei 27°C kultiviert. 0, 24, 48, 72, 96 und 118 h nach der Infektion wurden Proben gezogen (4 ml), die Zellen sedimentiert, in 1 ml Lysispuffer resuspendiert und mit Ultraschall homogenisiert [siehe Beispiel 3]. Die Homogenate wurden 15 min bei 20000 x g zentrifugiert, und das unlösliche Pellet wurde erneut in Lysispuffer resuspendiert. Die Proben wurden auf 50 % Glycerin (Vol/Vol) gebracht und bei -20°C gelagert. Die

Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch mit der Standardmethode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Die sGC-Aktivität wurde durch die Umsetzung von  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  zu  $[\text{32P}]\text{-cGMP}$  bestimmt (Schultz und Böhme, 1984). Die Reaktionsansätze enthielten 50 mM TEA (pH 7,4), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM DTT, 1 mM IBMX, 1 mM cGMP, 5 mM Kreatinphosphat, 0,25 mg/ml Kreatinkinase und 500  $\mu\text{M}$  GTP in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$ , und wurden für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch gleichzeitige Zugabe von Zellextrakt und den sGC-Aktivatoren SNP, CO oder YC-1 gestartet. Das gebildete  $[\text{32P}]\text{cGMP}$  wurde gemessen wie beschrieben (Schultz und Böhme, 1984).

Basale rhsGC-Aktivität (d.h. cGMP-Bildung durch rhsGC *ohne* Aktivierung des Enzyms durch Zugabe von NO oder anderen Aktivatoren) wurde hauptsächlich in der löslichen Sf9-Zellfraktion gefunden (Abb. 11A), war 72 h nach Infektion der Zellen maximal, und wurde mit 100  $\mu\text{M}$  SNP bis zu 5-fach stimuliert (Abb. 11A). Die Pelletfraktion enthielt zu keinem Zeitpunkt meßbare basale sGC-Aktivität; unter SNP-Stimulation wurde eine geringe sGC-Aktivität gefunden (Abb. 11B).

### Beispiel 6

#### *Einfluß von YC-1 und ODQ auf rekombinante humane sGC*

Mit YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol) und ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]chinoxalin-1-on) sind Substanzen beschrieben, welche die Aktivität von sGC spezifisch beeinflussen können. Es wurde daher untersucht, ob dies auch für rhsGC zutrifft.

Nach Expression mit den oben beschriebenen rekombinanten Baculoviren (ohne GST-Tag) wurde die rhsGC in intakten Sf9-Zellen durch YC-1 aktiviert, und auch der NO-potenzierende Effekt wurde gefunden: der cGMP-Gehalt rhsGC-exprimierender Zellen wurde durch Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  YC-1 für 2 min um das 3,4-fache erhöht (Abb. 10A). 100  $\mu\text{M}$  YC-1 hatten den gleichen Effekt (Abb. 10A).

Wurden die Zellen gleichzeitig mit YC-1 und 100  $\mu\text{M}$  SNP behandelt, verdoppelten

sich die cGMP-Spiegel, verglichen mit den durch SNP allein erreichten cGMP-Spiegeln (Abb. 10A). Ähnliche Resultate wurden mit rhsGC in Zellextrakten erzielt. ODQ ist als selektiver Inhibitor NO-stimulierter sGC beschrieben, der jedoch nicht die Basalaktivität hemmt (Garthwaite et al., 1995). In rhsGC-exprimierenden Sf9-Zellen (nach Expression mit den oben beschriebenen rekombinanten Baculoviren, ohne GST-Tag) hatte ODQ keinen Einfluß auf die basalen cGMP-Spiegel; die Stimulation von rhsGC in intakten Zellen mit SNP wurde jedoch durch gleichzeitige Inkubation mit ODQ inhibiert (Abb. 10B).

10

### Beispiel 7

#### *Gewinnung der gereinigten humanen Guanylylcyclase $\alpha 1/\beta 1$ (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ )*

Zur Reinigung der rekombinanten humanen sGC $\alpha 1/\beta 1$  aus den Sf9-Zellen, wurde ein rekombinanter Baculovirus [siehe Beispiel 2] eingesetzt, bei dem ein Fusionsprotein aus hsGC $\alpha 1$  und anhängendem GST [der sogenannte GST-Tag; GST = Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum*; vgl. Bsp. 2] gebildet wird. Über diesen GST-Tag, der mit hoher Affinität Glutathion bindet, ist eine spezifische Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B, (Fa. Pharmacia, Freiburg) möglich. Die mit hsGC $\alpha 1$ -Baculoviren (mit GST-Tag) und hsGC $\beta 1$ -Baculoviren (ohne GST-Tag) koinfizierten Sf9-Zellen wurden in 25 mM Triethanolamin pH 7,8 / 1 mM EDTA / 5 mM DTT / 1  $\mu$ M Leupeptin / 0,5  $\mu$ g/ml Trypsininhibitor / 0,2 mM PMSF lysiert (30 min hypotone Lyse bei 4°C). Nach Zugabe von NaCl auf 75 mM Endkonzentration wurde das Homogenat für 1h bei 75000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit GSH-Sepharose 4B für eine Stunde bei Raumtemperatur gemischt. Die Glutathion-Sepharose 4B wurde dann bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Glutathion-Sepharose 4B wurde mit dem 10fachen Volumen 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 150 mM NaCl / 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> / 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, für eine Minute gemischt und erneut bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und die Glutathion-Sepharose 4B nochmals auf die gleiche Art

gewaschen. Die Elution erfolgte dadurch, daß das hsGC $\alpha$ 1-Protein (mit dem daran gebundenen hsGC $\beta$ 1) durch Thrombin an der spezifischen Schnittstelle von dem GST-Tag getrennt wurde, der an die Glutathion-Sepharose 4B gebundenen blieb. Der Thrombinverdau erfolgte dabei in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 150 mM NaCl / 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> / 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol mit 0,25 bis 1 Einheiten Thrombin / ml Puffer für 1 oder 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die Glutathion-Sepharose 4B (mit dem GST-Tag) wurde erneut 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand mit der abgespaltenen hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 abgenommen. Eine andere Elutionsmethode erfolgte durch Zugabe von 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 5 mM reduziertes Glutathion und Mischen für 30 min bei Raumtemperatur. Dadurch wurde hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 mitsamt dem anhängenden GST-Tag von der Glutathion-Sepharose 4B abgelöst. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 5 min wurde der Überstand mit darin gelöstem GST-hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 abgenommen.

Durch die Elution mit Thrombin ergibt sich mit einem einzigen, affinitätschromatografischen Schritt eine doppelte Selektivität:

1.) Es binden nur Proteine, die eine Affinität zu reduziertem Glutathion zeigen.

2.) Von diesen Proteinen werden nur diese (als Spaltprodukte) eluiert, die von Thrombin gespalten werden.

Die Abtrennung des Thrombins kann über eine p-Aminobenzamidinsäule erfolgen, an die das Thrombin spezifisch bindet.

Abb. 12 zeigt im Vergleich zum Lysat der infizierten Sf9-Zellen die spezifische Anreicherung der sGC-Aktivität nach Elution von der GSH-Sepharose 4B mit Glutathion.

Abb. 14 zeigt im Immunoblot die Bindung von GST-hsGC $\alpha$ 1 an Glutathion-Sepharose 4B und die Abspaltung des hsGC $\alpha$ 1 vom GST-Tag durch Thrombin.

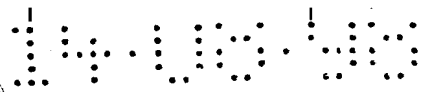


Abb. 15 zeigt im mit Coomassie-Brilliant-Blue-R250 gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel den Nachweis der Reinigung von koexprimierter hsGC $\alpha$ 1 mit GST-Tag und hsGC $\beta$ 1 ohne GST-Tag durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B. Bei Elution mit reduziertem Glutathion waren nur zwei Banden zu erkennen, die GST-hsGC $\alpha$ 1 (größeres Produkt) und hsGC $\beta$ 1 (kleineres Produkt) entsprechen (nachgewiesen im Immunoblot). Wurde dagegen mit Thrombin eluiert (0,25 oder 0,5 oder 1 Einheit/ml für 3 Stunden bei Raumtemperatur), so war die untere Bande identisch (hsGC $\beta$ 1; Molekulargewicht wurde nach Laufverhalten geschätzt auf ca. 70 kDa), die obere Bande war im Vergleich zur Elution mit Glutathion deutlich kleiner (hsGC $\alpha$ 1; Molekulargewicht wurde geschätzt auf ca. 80 kDa), da bei der Thrombinelution der GST-Tag abgespalten wird. Dies entspricht in etwa den aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz vorhergesagten Molekulargewichten von 77,5 kDa für hsGC $\alpha$ 1 und 70,5 kDa für hsGC $\beta$ 1. Bei der Elution durch Thrombin war anders als bei der Elution durch reduziertes Glutathion noch eine sehr kleine Bande von etwa 25 kDa zu erkennen, die Thrombin selbst darstellen dürfte. Das Thrombin kann aus dem Eluat durch eine p-Aminobenzamidin-Sepharose-Säule entfernt werden, an die Thrombin spezifisch bindet. Andere Banden waren bei dem Versuch nicht erkennbar.

20

### Beispiel 8

#### *Herstellung von polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1.*

Antiseren wurden gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen gegen synthetische Peptide, die der hsGC $\alpha$ 1 (Phe-Thr-Pro-Arg-Ser-Arg-Glu-Glu-Leu-Pro-Pro-Asn-Phe-Pro (Abb. 22/SEQ IN NO: 5); Aminosäuren 634-647) bzw. der hsGC $\beta$ 1 (Lys-Gly-Lys-Lys-Glu-Pro-Met-Gln-Val-Trp-Phe-Leu-Ser-Arg-Lys-Asn-Thr-Gly-Thr-Glu-Glu-Thr (Abb. 23/SEQ ID NO: 6); Aminosäuren 593-614) entsprechen, und die an KLH (Keyhole limpet hemocyanin) über einen zusätzlichen C-terminalen ( $\alpha$ 1) oder N-terminalen ( $\beta$ 1) Cysteinrest gekoppelt wurden. Die Antiseren wurden



affinitätsgereinigt mit den jeweiligen Peptiden, die an Epoxy-aktivierte Sepharose (Pharmacia, Freiburg) gekoppelt wurden (nach Anleitung des Herstellers).

5

### Beispiel 9

*Nachweis der hSGC $\alpha$ 1 und hSGC $\beta$ 1 in verschiedenen humanen Geweben im Immunoblot.*

Humanes Lungengewebe wurde von einem tumorfreien Bereich einer Lungenresektion bezogen, humanes Cortex und Cerebellum von einer normalen Autopsie. Alle Gewebe waren sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert worden. Die gefrorenen Gewebe wurden gemörstert und das Pulver in 2 x konzentriertem, vorerhitztem SDS-Stopp-Puffer (130 mM Tris-HCl pH 6,8 / 16 % [v/v] Glycerin / 4 % [w/v] SDS / 0,025 % [w/v] Bromphenolblau / 6,5 % [v/v]  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen, 10 min bei 95°C inkubiert und dann 20 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Immunoblot eingesetzt (Antikörper siehe oben).

In allen drei Geweben kann eine Expression beider Untereinheiten ( $\alpha$ 1 und  $\beta$ 1) nachgewiesen werden (Abb. 13). Keine Expression konnte dagegen in Niere, Leber und Pankreas gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

### Beispiel 10

*Konstruktion von rekombinanten adenoviralen hSGC-Vektoren*

25

Die cDNAs für die hSGC $\alpha$ 1 und hSGC $\beta$ 1 wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI als Fragmente von 3,0 kb (hSGC $\alpha$ 1) bzw. 2,4 kb (hSGC $\beta$ 3) aus dem Originalplasmid herausgeschnitten. Diese Fragmente wurden jeweils in die EcoRI-Schnittstellen des adenoviralen Transferplasmids pZS2 inseriert (Abb. 16), das eine Adenovirus-Typ-5-Sequenz (Ad5) mit einer Deletion in der E1-Region ( $\Delta$ E1) enthält, gefolgt von einer Expressionskassette mit CMV- (Cytomegalovirus) Promotor/-Enhancer und einer in

diesem Plasmid einmaligen XbaI-Restriktions-Schnittstelle. XbaI-geschnittenes hsGC $\alpha$ 1-pZS2 und hsGC $\beta$ 1-pZS2 wurde in die XbaI-Schnittstelle des langen Armes (RR5) von Ad5 inseriert (Abb. 16). Dies ergab die Adenovektoren Ad5CMVhsGC $\alpha$ 1 bzw. Ad5CMVhsGC $\beta$ 1. Die resultierenden rekombinanten Adenovirusvektoren sind replikationsdefizient, da ihnen der E1-Bereich fehlt. Zur Vermehrung der Viren wurden 293-Zellen, die E1 exprimieren, mit diesen Viren infiziert. Virale Plaques erschienen 12 bis 24 Stunden nach der Transfektion, und Viren aus Einzelplaques wurden nach einem Standardprotokoll aufgereinigt. Plaques, die rekombinantes Virus enthalten (Ad5CMVhsGC $\alpha$ 1 oder Ad5CMVhsGC $\beta$ 1) wurden durch PCR-Analyse identifiziert: Das Plaque-Material wurde dreimal eingefroren und aufgetaut, bei 37°C für 30 min in Lysepuffer (16,6 mM Ammoniumsulfat / 67 mM Tris-HCl pH 6,8 / 6,7 mM MgCl<sub>2</sub> / 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol / 6,7 mM EDTA / 1,7 mM SDS / 50  $\mu$ g/ml Proteinase K) inkubiert, und dann für 10 min bei 85°C hitzeinaktiviert. Schließlich wurde die DNA mit einer Standard-Phenol/Chloroform-Extraktion aus dem Lysat isoliert und einer PCR-Analyse unterzogen.

### Beispiel 11

*Nachweis der cGMP-Bildung in EA.hy926-Zellen nach Koinfektion mit den hsGC-Adenovektoren Ad5CMVhsGC $\alpha$ 1 und Ad5CMVhsGC $\beta$ 1*

Zehn 10-cm-Platten mit "EA.hy926"-Zellen wurden mit je  $2 \times 10^{10}$  pfu (Plaquesbildende Einheiten) pro Platte koinfiziert. Die Ernte erfolgte nach ca. 72 Stunden durch Zugabe von hypotonem Lysepuffer (25 mM Triethanolamin pH 7,8 / 1 mM EDTA / 5 mM DTT / 1  $\mu$ M Leupeptin / 0,5 mg/l Trypsin-Inhibitor / 0,2 mM PMSF) und Ablösen mit einem Gummischaber. Das Homogenat wurde für 15 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand mit einem gleichen Volumen Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert. Die hsGC-Stimulierbarkeit durch 100  $\mu$ M SNP (Nitroprussidnatrium) wurde ermittelt durch Messung der cGMP-Konzentration und des cGMP-Gehaltes basal und nach SNP-Stimulation wie oben beschrieben

[siehe Beispiel 5]. In drei Ansätzen (A, B, C) war im Vergleich zur Basalaktivität eine 7fache bis 10,75fach erhöhte cGMP-Konzentration nach SNP-Stimulation nachweisbar, während in der Kontrolle ohne Adenovirusinfektion keine signifikante Erhöhung zu messen war (Abb. 17).

Literatur:

Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

5 Friebe, A.; Schultz, G.; Koesling, D. (1996) *EMBO J.* 15: 6863-6868.

Garthwaite, J.; Southam, E.; Boulton, C. L.; Nielsen, E. B.; Schmidt, K.; Mayer, B. (1995) *Mol. Pharmacol.* 48: 184-188.

10 Giuili, G.; Scholl, U.; Bulle, F.; Guellaen, G. (1992) *FEBS Lett.* 304: 83-88.

Guthmann, F.; Mayer, B.; Koesling, D.; Kukovetz, W.R.; Boehme, E. (1992) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 346: 537-541.

Harteneck, C.; Wedel, B.; Koesling, D.; Malkewitz, J.; Böhme, E.; Schultz, G. (1991) *FEBS Lett.* 292: 217-222.

Humbert, P.; Niroomand, F.; Fischer, G.; Mayer, B.; Koesling, D.; Hinsch, K.-D.; Gausepohl, H.; Frank, R.; Schultz, G.; Böhme, E. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190: 273-278.

20 Ko, F. N.; Wu, C. C.; Kuo, S.-C.; Lee, F.-Y.; Teng, C.M. (1994) *Blood* 84: 4226-4233.

Koesling, D.; Herz, J.; Gausepohl, H.; Niroomand, F.; Hinsch, K.-D.; Mülsch, A.; Böhme, E.; Schultz, G.; Frank, R. (1988) *FEBS Lett.* 239: 29-34.

25 Schmidt, H. H. H. W.; Walter, U. (1994) *Cell* 78: 919-925.

Schultz, G.; Böhme, E. (1984) erschienen in: Bergmeyer, H. U.; Bergmeyer, J.; Graßl, M. (Hrsg.): *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4, Verlag Chemie, Weinheim, Seiten 379-389.

Wu, C.-C.; Ko, F.-N.; Kuo, S.-C.; Lee, F.-Y.; Teng, C.-M. (1995) *British J. Pharmacol.* 116: 1973-1978.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Vasopharm Biotech GmbH & Co. KG
- (B) STRASSE: Leichtackerstr. 6
- (C) ORT: Veitshöchheim
- (D) BUNDESLAND: Bayern
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 97209
- (G) TELEFON:

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Isolierte und gereinigte humane lösliche Guanylylcyclase  $\alpha 1/\beta 1$  (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ )

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3015 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CCCTTATGGC	GATTGGGCGG	CTGCAGAGAC	CAGGACTCAG	TTCCCCTGCC	CTAGTCTGAG	60
CCTAGTGGGT	GGGACTCAGC	TCAGAGTCAG	TTTTCCAGAA	GCAGGTTTCA	GTGCAGAGTT	120
TTCTTACACT	TTTCCTGCGC	TAGAGCAGCG	AGCAGCCTGG	AACAGACCCA	GGCGGAGGAC	180
ACCTGTGGGG	GAGGGAGCGC	CTGGAGGAGC	TTAGAGACCC	CAGCCGGGCG	TGATCTCACC	240
ATGTGCGGAT	TTGCGAGGCG	CGCCCTGGAG	CTGCTAGAGA	TCCGGAAGCA	CAGCCCCGAG	300
GTGTGCGAAG	CCACCAAGAC	TGCGGCTCTT	GGAGAAAGCG	TGAGCAGGGG	GCCACCGCGG	360
TCTCCGCGCC	TGTCTGCACC	CTGTCGCCTG	AGCTGCCTGA	CAGTGACAAT	GACATCCCAG	420
TTACCAAGTG	CCTTGAATTG	ATAGTGGCTT	CTGTTTGTCA	GTCTCATATA	AGAACTACAG	480
CTCATCAGGA	GGAGATCGCA	GCAGGGTAAG	AGACACCAAC	ACCATGTTCT	GCACGAAGCT	540
CAAGGATCTC	AAGATCACAG	GAGAGTGTCC	TTTCTCCTTA	CTGGCACCAG	GTCAAGTTCC	600
TAACGAGTCT	TCAGAGGAGG	CAGCAGGAAG	CTCAGAGAGC	TGCAAAGCAA	CCGTGCCCAT	660
CTGTCAAGAC	ATTCCTGAGA	AGAACATACA	AGAAAGTCTT	CCTCAAAGAA	AAACCAGTCG	720
GAGCCGAGTC	TATCTTCACA	CTTTGGCAGA	GAGTATTTGC	AAACTGATTT	TCCCAGAGTT	780
TGAACGGCTG	AATGTTGCAC	TTCAGAGAAC	ATTGGCAAAG	CACAAAATAA	AAGAAAGCAG	840
GAAATCTTTG	GAAAGAGAAG	ACTTTGAAAA	AACAATTGCA	GAGCAAGCAG	TTGCAGCAGG	900
AGTTCCAGTG	GAGGTTATCA	AAGAATCTCT	TGGTGAAGAG	GTTTTTAAAA	TATGTTACGA	960
GGAAGATGAA	AACATCCTTG	GGGTGGTTGG	AGGCACCCTT	AAAGATTTTT	TAAACAGCTT	1020
CAGTACCCTT	CTGAAACAGA	GCAGCCATTG	CCAAGAAGCA	GGAAAAAGGG	GCAGGCTTGA	1080

```

GGACGCCTCC ATTG GCC TGGATAAGGA GGATGATTTT CTAGTTT ACTACTTCTT 1140
CCCTAAGAGA ACCACCTCCC TGATTCTTCC CGGCATCATA AAGGCAGCTG CTCACGTATT 1200
ATATGAAACG GAAGTGGAAG TGTCGTTAAT GCCTCCCTGC TTCCATAATG ATTGACGCGA 1260
GTTTGTGAAT CAGCCCTACT TGTGTACTC CGTTCACATG AAAAGCACCA AGCCATCCCT 1320
GTCCCCCAGC AAACCCAGT CCTCGCTGGT GATTCCCACA TCGCTATTCT GCAAGACATT 1380
TCCATTCCAT TTCATGTTTG ACAAAGATAT GACAATTCTG CAATTTGGCA ATGGCATCAG 1440
AAGGCTGATG AACAGGAGAG ACTTTCAAGG AAAGCCTAAT TTTGAAGAAT ACTTTGAAAT 1500
TCTGACTCCA AAAATCAACC AGACGTTTAG CGGGATCATG ACTATGTTGA ATATGCAGTT 1560
TGTTGTACGA GTGAGGAGAT GGGACAAC TC TGTGAAGAAA TCTTCAAGGG TTATGGACCT 1620
CAAAGGCCAA ATGATCTACA TTGTTGAATC CAGTGCAATC TTGTTTTTGG GGTACCCCTG 1680
TGTGGACAGA TTAGAAGATT TTACAGGACG AGGGCTCTAC CTCTCAGACA TCCCAATTCA 1740
CAATGCACTG AGGGATGTGG TCTTAATAGG GGAACAAGCC CGAGCTCAAG ATGGCCTGAA 1800
GAAGAGGCTG GGAAGCTGA AGGCTACCCT TGAGCAAGCC CACCAAGCCC TGGAGGAGGA 1860
GAAGAAAAAG ACAGTAGACC TTCTGTGCTC CATATTTCCC TGTGAGGTTG CTCAGCAGCT 1920
GTGGCAAGGG CAAGTTGTGC AAGCCAAGAA GTTCAGTAAT GTCACCATGC TCTTCTCAGA 1980
CATCGTTGGG TTCACTGCCA TCTGCTCCCA GTGCTCACCG CTGCAGGTCA TCACCATGCT 2040
CAATGCACTG TACACTCGCT TCGACCAGCA GTGTGGAGAG CTGGATGTCT ACAAGGTGGA 2100
GACCATTGGC GATGCCTATT GTGTAGCTGG GGGATTACAC AAAGAGAGTG ATACTCATGC 2160
TGTTTCAGATA GCGCTGATGG CCCTGAAGAT GATGGAGCTC TCTGATGAAG TTATGTCTCC 2220
CCATGGAGAA CCTATCAAGA TGCGAATTGG ACTGCACTCT GGATCAGTTT TTGCTGGCGT 2280
CGTTGGAGTT AAAATGCCCC GTTACTGTCT TTTTGAAAC AATGTCCTC TGGCTAACAA 2340
ATTTGAGTCC TGCAGTGAC CACGAAAAAT CAATGTCAGC CCAACAACTT ACAGATTACT 2400
CAAAGACTGT CCTGGTTTCG TGTTTACCCC TCGATCAAGG GAGGAACTTC CACCAAACTT 2460
CCCTAGTGAA ATCCCCGAA TCTGCCATTT TCTGGATGCT TACCAACAAG GAACAACTC 2520
AAAACCATGC TTCCAAAAGA AAGATGTGGA AGATGGCAAT GCCAATTTTT TAGGCAAAGC 2580
ATCAGGAATA GATTAGCAAC CTATATACCT ATTTATAAGT CTTTGGGGTT TGA CTATTG 2640
AAGATGTGTA GAGCCTCTGA AAGCACTTTA GGGATTGTAG ATGGCTAACA AGCAGTATTA 2700
AAATTTTCAGG AGCCAAGTCA CAATCTTTCT CCTGTTTAA ACATGACAAAAT GTACTCACTT 2760
CAGTACTTCA GCTCTTCAAG AAAAAAAAAA AAACCTTAAA AAGCTACTTT TGTGGGAGTA 2820
TTTCTATTAT ATAACCAGCA CTTACTACCT GTACTCAAAA TTCAGCACCT TGTACATATA 2880
TCAGATAATT GTAGTCAATT GTACAACTG ATGGAGTCAC CTGCAATCTC ATATCCTGGT 2940
GGAATGCCAT GGTTATTAAA GTGTGTTTGT GATAGTGTCG TCAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 3000
AAAAAAAAAA AAAAA 3015

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 695 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein (humanen löslichen Guanylylcyclase a1 (hsGCal))

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Phe Cys Thr Lys Leu Lys Asp Leu Lys Ile Thr Gly Glu Cys Pro
      5                      10                      15
Phe Ser Leu Leu Ala Pro Gly Gln Val Pro Asn Glu Ser Ser Glu Glu
      20                      25                      30
Ala Ala Gly Ser Ser Glu Ser Cys Lys Ala Thr Val Pro Ile Cys Gln
      35                      40                      45
Asp Ile Pro Glu Lys Asn Ile Gln Glu Ser Leu Pro Gln Arg Lys Thr
      50                      55                      60
Ser Arg Ser Arg Val Tyr Leu His Thr Leu Ala Glu Ser Ile Cys Lys
      65                      70                      75                      80

```

Leu Ile Phe Pro Glu Phe Glu Arg Leu Asn Val Ala Leu Gln Arg Thr  
 85 90 95  
 Leu Ala Lys His Lys Ile Lys Glu Ser Arg Lys Ser Leu Glu Arg Glu  
 100 105 110  
 Asp Phe Glu Lys Thr Ile Ala Glu Gln Ala Val Ala Ala Gly Val Pro  
 115 120 125  
 Val Glu Val Ile Lys Glu Ser Leu Gly Glu Glu Val Phe Lys Ile Cys  
 130 135 140  
 Tyr Glu Glu Asp Glu Asn Ile Leu Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Phe Leu Asn Ser Phe Ser Thr Leu Leu Lys Gln Ser Ser His Cys  
 165 170 175  
 Gln Glu Ala Gly Lys Arg Gly Arg Leu Glu Asp Ala Ser Ile Leu Cys  
 180 185 190  
 Leu Asp Lys Glu Asp Asp Phe Leu His Val Tyr Tyr Phe Phe Pro Lys  
 195 200 205  
 Arg Thr Thr Ser Leu Ile Leu Pro Gly Ile Ile Lys Ala Ala Ala His  
 210 215 220  
 Val Leu Tyr Glu Thr Glu Val Glu Val Ser Leu Met Pro Pro Cys Phe  
 225 230 235 240  
 His Asn Asp Cys Ser Glu Phe Val Asn Gln Pro Tyr Leu Leu Tyr Ser  
 245 250 255  
 Val His Met Lys Ser Thr Lys Pro Ser Leu Ser Pro Ser Lys Pro Gln  
 260 265 270  
 Ser Ser Leu Val Ile Pro Thr Ser Leu Phe Cys Lys Thr Phe Pro Phe  
 275 280 285  
 His Phe Met Phe Asp Lys Asp Met Thr Ile Leu Gln Phe Gly Asn Gly  
 290 300 305  
 Ile Arg Arg Leu Met Asn Arg Arg Asp Phe Gln Gly Lys Pro Asn Phe  
 310 315 320 325  
 Glu Glu Tyr Phe Glu Ile Leu Thr Pro Lys Ile Asn Gln Thr Phe Ser  
 330 335 340  
 Gly Ile Met Thr Met Leu Asn Met Gln Phe Val Val Arg Val Arg Arg  
 345 350 355  
 Trp Asp Asn Ser Val Lys Lys Ser Ser Arg Val Met Asp Leu Lys Gly  
 360 365 370  
 Gln Met Ile Tyr Ile Val Glu Ser Ser Ala Ile Leu Phe Leu Gly Ser  
 375 380 385  
 Pro Cys Val Asp Arg Leu Glu Asp Phe Thr Gly Arg Gly Leu Tyr Leu  
 390 395 400 405  
 Ser Asp Ile Pro Ile His Asn Ala Leu Arg Asp Val Val Leu Ile Gly  
 410 415 420  
 Glu Gln Ala Arg Ala Gln Asp Gly Leu Lys Lys Arg Leu Gly Lys Leu  
 425 430 435  
 Lys Ala Thr Leu Glu Gln Ala His Gln Ala Leu Glu Glu Glu Lys Lys  
 440 445 450  
 Lys Thr Val Asp Leu Leu Cys Ser Ile Phe Pro Cys Glu Val Ala Gln  
 455 460 465  
 Gln Leu Trp Gln Gly Gln Val Val Gln Ala Lys Lys Phe Ser Asn Val  
 470 475 480 485  
 Thr Met Leu Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Ala Ile Cys Ser Gln  
 490 495 500  
 Cys Ser Pro Leu Gln Val Ile Thr Met Leu Asn Ala Leu Tyr Thr Arg  
 505 510 515  
 Phe Asp Gln Gln Cys Gly Glu Leu Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile  
 520 525 530  
 Gly Asp Ala Tyr Cys Val Ala Gly Gly Leu His Lys Glu Ser Asp Thr  
 535 540 545  
 His Ala Val Gln Ile Ala Leu Met Ala Leu Lys Met Met Glu Leu Ser

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(A) LÄNGE: 2443 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

CCCCCCCCCG	CCGCTGCCGC	CTCTGCCTGG	GTCCCTTCGG	CCGTACCTCT	GCCTGGGGGC	60
TGCCTCCCCG	GCTCCCGGTG	CAGACACCAT	GTACGGATT	GTGAATCACG	CCCTGGAGTT	120
GCTGGTGATC	CGCAATTACG	GCCCCGAGGT	GTGGGAAGAC	ATCAAAAAAG	AGGCACAGTT	180
AGATGAAGAA	GGACAGTTTC	TTGTCTAGAAT	AATATATGAT	GAATCCAAAA	CTTATGATTT	240
GGTTGTCTGT	GCAAGCAAAAG	TCCTCAATCT	CAATGCTGGA	GAAATCCTCC	AAATGTTTGG	300
GAAGATGTTT	TTCTGTCTTTT	GCCAAGAATC	TGGTTATGAT	ACAATCTTGC	GTGTCTCTGGG	360
CTCTAATGTC	ATGAGAATTTT	TACAGAACCT	TGATGCTCTG	CACGACCACC	TTGCTACCAT	420
CTACCCAGGA	ATGCGTGCAC	CTTCCTTTAG	GTGCACTGAT	GCAGAAAAGG	GCAAAGGACT	480
CATTTTGCAC	TACTACTCAG	AGAGAGAAGG	ACTTCAGGAT	ATTGTCATTG	GAATCATCAA	540
AACAGTGGCA	CAACAAATCC	ATGGCACTGA	AATAGACATG	AAGGTTATTC	AGCAAAGAAA	600
TGAAGAATGT	GATCATACTC	AATTTTTTAAT	TGAAGAAAAA	GAGTCAAAAG	AAGAGGATTT	660
TTATGAAGAT	CTTGACAGAT	TTGAAGAAAA	TGGTACCCAG	GAATCACGCA	TCAGCCCATA	720
TACATTCTGC	AAAGCTTTTC	CTTTTCATAT	AATATTGAC	CGGGACCTAG	TGGTCACTCA	780
GTGTGGCAAT	GCTATATACA	GAGTTCCTCC	CCAGCTCCAG	CCTGGGAATT	GCAGCCTTCT	840
GTCTGTCTTC	TCGCTGGTTC	GTCCTCATAT	TGATATTAGT	TTCCATGGGA	TCCTTTCTCA	900
CATCAATACT	GTTTTTGTAT	TGAGAAGCAA	GGAAGGATTG	TTGGATGTGG	AGAAATTAGA	960
ATGTGAGGAT	GAAGTACTG	GGACTGAGAT	CAGCTGCTTA	CCTCTCAAGG	GTCAAATGAT	1020
CTACTTACCT	GAAGCAGATA	GCATACTTTT	TCTATGTTCA	CGAAGTGTC	TGAACCTGGA	1080
CGATTTGACA	AGGAGAGGGC	TGATCTAAG	TGACATCCCT	CTGCATGATG	CCACGCGCGA	1140
TCTTGTTCTT	TTGGGAGAAC	AATTTAGAGA	GGAATACAAA	CTCACCCAAG	AACTGGAAAT	1200
CCTCACTGAC	AGGCTACAGC	TCACGTTAAG	AGCCCTGGAA	GATGAAAAAG	AAAAGACAGA	1260
CACATTGTCTG	TATTCTGTCC	TTCTCTCGTC	TGTTGCCAAT	GAGCTGCGGC	ACAAGCGTCC	1320
AGTGCCTGCC	AAAAGATATG	ACAATGTGAC	CATCTCTTT	AGTGGCATTG	TGGGCTTCAA	1380
TGCTTTCTGT	AGCAAGCATG	CATCTGGAGA	AGGAGCCATG	AAGATCGTCA	ACCTCCTCAA	1440
CGACCTCTAC	ACCAGATTTG	ACACACTGAC	TGATTCCCGG	AAAAACCCAT	TTGTTTATAA	1500



GGTGGAGACT GTTGGTGACA AGTATATGAC AGTGAGTGGT TTACCAGAGC CATGCATTCA 1560  
 CCATGCACGA TCCATCTGCC ACCTGGCCTT GGACATGATG GAAATTGCTG GCCAGGTTCA 1620  
 AGTAGATGGT GAATCTGTTC AGATAACAAT AGGGATACAC ACTGGAGAGG TAGTTACAGG 1680  
 TGTCATAGGA CAGCGGATGC CTCGATACTG TCTTTTGGG AATACTGTCA ACCTCACAAG 1740  
 CCGAACAGAA ACCACAGGAG AAAAGGGAAA AATAAATGTG TCTGAATATA CATACAGATG 1800  
 TCTTATGTCT CCAGAAAATT CAGATCCACA ATTCCACTTG GAGCACAGAG GCCCAGTGTC 1860  
 CATGAAGGGC AAAAAAGAAC CAATGCAAGT TTGGTTTCTA TCCAGAAAAA ATACAGGAAC 1920  
 AGAGGAAACA AAGCAGGATG ATGACTGAAT CTTGGATTAT GGGGTGAAGA GGAGTACAGA 1980  
 CTAGGTTCCA GTTTTCTCCT AACACGTGCC AAGCCCAGGA GCAGTCTTTC CCTATGGATA 2040  
 CAGATTTTCT TTTGTCTTGT TCCATTACCC CAAGACTTTC TTCTAGATAT ATCTCTCACT 2100  
 ATCCGTTATT CAACCTTAGC TCTGCTTTCT ATTACTTTTT AGGCTTTAGT ATATTATCTA 2160  
 AAGTTTGGCT TTTGATGTGG ATGATGTGAG CTTCATGTGT CTTAAAATCT ACTACAAGCA 2220  
 TTACCTAACA TGGTGATCTG CAAGTAGTAG GCACCCAATA AATATTTGTT GAATTTAGTT 2280  
 AAATGAACT GAACAGTGTT TGGCCATGTG TATATTTATA TCATGTTTAC CAAATCTGTT 2340  
 TAGTGTTCCT CATATATGTA TATGTATATT TTAATGACTA TAATGTAATA AAGTTTATAT 2400  
 CATGTTGGTG TATATCATT TAGAAATCAT TTTCTAAAGG AGT 2443

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 619 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein (humanen löslichen Guanylylcyclase b1 (hsGCB1))

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Tyr	Gly	Phe	Val	Asn	His	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Ile	Arg	Asn	5	10	15
Tyr	Gly	Pro	Glu	Val	Trp	Glu	Asp	Ile	Lys	Lys	Glu	Ala	Gln	Leu	Asp	20	25	30
Glu	Glu	Gly	Gln	Phe	Leu	Val	Arg	Ile	Ile	Tyr	Asp	Asp	Ser	Lys	Thr	35	40	45
Tyr	Asp	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys	Val	Leu	Asn	Leu	Asn	Ala	Gly	50	55	60
Glu	Ile	Leu	Gln	Met	Phe	Gly	Lys	Met	Phe	Phe	Val	Phe	Cys	Gln	Glu	65	70	75
Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Arg	Glu	85	90	95
Phe	Leu	Gln	Asn	Leu	Asp	Ala	Leu	His	Asp	His	Leu	Ala	Thr	Ile	Tyr	100	105	110
Pro	Gly	Met	Arg	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Cys	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly	115	120	125
Lys	Gly	Leu	Ile	Leu	His	Tyr	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Gly	Leu	Gln	Asp	130	135	140
Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Ile	Lys	Thr	Val	Ala	Gln	Gln	Ile	His	Gly	Thr	145	150	155
Glu	Ile	Asp	Met	Lys	Val	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Glu	Glu	Cys	Asp	His	165	170	175
Thr	Gln	Phe	Leu	Ile	Glu	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	180	185	190
Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Phe	Glu	Glu	Asn	Gly	Thr	Gln	Glu	Ser	Arg	Ile	195	200	205
Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Cys	Lys	Ala	Phe	Pro	Phe	His	Ile	Ile	Phe	Asp	210	215	220

Arg Asp Leu Val Val Thr Gln Cys Gly Asn Ala Ile Tyr Arg Val Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Gln Leu Gln Pro Gly Asn Cys Ser Leu Leu Ser Val Phe Ser Leu  
 245 250 255  
 Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile  
 260 265 270  
 Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu  
 275 280 285  
 Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Thr Glu Ile Ser Cys Leu  
 290 295 300  
 Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg  
 325 330 335  
 Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu  
 340 345 350  
 Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu  
 355 360 365  
 Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu  
 370 375 380  
 Asp Glu Lys Lys Lys Thr Asp Thr Leu Leu Tyr Ser Val Leu Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Val Ala Asn Glu Leu Arg His Lys Arg Pro Val Pro Ala Lys Arg  
 405 410 415  
 Tyr Asp Asn Val Thr Ile Leu Phe Ser Gly Ile Val Gly Phe Asn Ala  
 420 425 430  
 Phe Cys Ser Lys His Ala Ser Gly Glu Gly Ala Met Lys Ile Val Asn  
 435 440 445  
 Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Arg Phe Asp Thr Leu Thr Asp Ser Arg  
 450 455 460  
 Lys Asn Pro Phe Val Tyr Lys Val Glu Thr Val Gly Asp Lys Tyr Met  
 465 470 475 480  
 Thr Val Ser Gly Leu Pro Glu Pro Cys Ile His His Ala Arg Ser Ile  
 485 490 495  
 Cys His Leu Ala Leu Asp Met Met Glu Ile Ala Gly Gln Val Gln Val  
 500 505 510  
 Asp Gly Glu Ser Val Gln Ile Thr Ile Gly Ile His Thr Gly Glu Val  
 515 520 525  
 Val Thr Gly Val Ile Gly Gln Arg Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly  
 530 535 540  
 Asn Thr Val Asn Leu Thr Ser Arg Thr Glu Thr Thr Gly Glu Lys Gly  
 545 550 555 560  
 Lys Ile Asn Val Ser Glu Tyr Thr Tyr Arg Cys Leu Met Ser Pro Glu  
 565 570 575  
 Asn Ser Asp Pro Gln Phe His Leu Glu His Arg Gly Pro Val Ser Met  
 580 585 590  
 Lys Gly Lys Lys Glu Pro Met Gln Val Trp Phe Leu Ser Arg Lys Asn  
 595 600 605  
 Thr Gly Thr Glu Glu Thr Lys Gln Asp Asp Asp  
 610 615

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(ii) ART DES MOLEKUELS: Peptid (Aminosäuren 593-614 der hsGCB1)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

AAAAGGATCC ATGTTCTGCA CGAAGCTC

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 18 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

ATTATGGAAG CAGGGAGG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

AAAAGGATCC ATGTACGGAT TTGTGAAT

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

ATGCGTGATT CCTGGGTACC

20

5

## PATENTANSPRÜCHE

1. Isolierte und zur apparenten Homogenität gereinigte humane lösliche  
 10 Guanylylcyclase  $\alpha 1/\beta 1$  (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ ).
2. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit  $\alpha 1$  und/oder  $\beta 1$  der humanen  
 löslichen Guanylylcyclase, umfassend die Expression von die DNA-Sequenz für  
 hsGC $\alpha 1$  und/oder hsGC $\beta 1$  enthaltenden Expressionsvektoren in prokaryontischen  
 15 oder eukaryontischen Wirtszellen und Gewinnung der Untereinheit bzw. der  
 Untereinheiten.
3. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit  $\alpha 1$  und/oder  $\beta 1$  der humanen  
 löslichen Guanylylcyclase gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der  
 20 Schritt der Gewinnung der Untereinheit bzw. der Untereinheiten eine Lyse der  
 Zellen, die Affinitätschromatographie des Zell-Lysats und die anschließende Elution  
 der Untereinheit(en) umfaßt.
4. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit  $\alpha 1$  und/oder  $\beta 1$  der humanen  
 25 löslichen Guanylylcyclase gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß  
 der Expressionsvektor zusätzlich mindestens eine DNA-Sequenz für eine Domäne  
 zur spezifischen Affinitätschromatographie (Affinitätstag) mit anhängender  
 Proteaseschnittstelle enthält.
- 30 5. Verfahren zur Herstellung der Untereinheit  $\alpha 1$  und/oder  $\beta 1$  der humanen  
 löslichen Guanylylcyclase gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der

Expressionsvektor die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha$ 1 mit Affinitätstag, die DNA-Sequenz für hsGC $\beta$ 1 mit Affinitätstag, die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha$ 1 mit Affinitätstag und die DNA-Sequenz für hsGC $\beta$ 1, die DNA-Sequenz für hsGC $\beta$ 1 mit Affinitätstag und die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha$ 1 oder die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha$ 1 mit Affinitätstag und die DNA-Sequenz für hsGC $\beta$ 1 mit Affinitätstag enthält.

6. Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 (hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1), umfassend die getrennte Expression eines die DNA-Sequenz für hsGC $\alpha$ 1 oder hsGC $\beta$ 1 enthaltenden Expressionsvektors in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, Gewinnung der Untereinheiten und Kombinieren der Untereinheiten hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 zur dimeren Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 (hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1).

7. Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 (hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1) gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt der Gewinnung der Untereinheiten eine getrennte Lyse der hsGC $\alpha$ 1 bzw. hsGC $\beta$ 1 enthaltenden Zellen, die getrennte Affinitätschromatographie der Zell-Lysate und die anschließende Elution der Untereinheiten umfaßt.

8. Verfahren zur Herstellung der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 (hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1), umfassend die Koexpression der DNA-Sequenzen für hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, eine Lyse der hsGC $\alpha$ 1 und hsGC $\beta$ 1 enthaltenden Zellen, die Affinitätschromatographie und die anschließende Elution von hsGC $\alpha$ 1/ $\beta$ 1.

9. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die Untereinheit hsGC $\alpha$ 1 und/oder hsGC $\beta$ 1 der humanen löslichen Guanylylcyclase  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 kodiert, für die somatische Gentherapie.

10. Verwendung nach Anspruch 9 zur Prävention und Therapie von Arteriosklerose und ihren Folgeerkrankungen, von Restenose, Ischämie (Infarkt), peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten und arterieller Hypertonie sowie zur Prävention bei Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose.

5

11. Antikörper gegen humane lösliche Guanylylcyclase  $\alpha 1/\beta 1$  (hsGC $\alpha 1/\beta 1$ ), erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit hsGC $\alpha 1/\beta 1$ , der Untereinheit  $\alpha 1$  oder  $\beta 1$  oder immunogenen Peptidfragmenten davon und Isolieren der Antikörper.

10 12. Antikörper nach Anspruch 11, erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit dem Peptidfragment Phe-Thr-Pro-Arg-Ser-Arg-Glu-Glu-Leu-Pro-Pro-Asn-Phe-Pro oder Teilen hieraus oder hiermit überlappenden immunogenen Peptidfragmenten.

15 13. Antikörper nach Anspruch 11, erhältlich durch Immunisieren eines Säugers mit dem Peptidfragment Lys-Gly-Lys-Lys-Glu-Pro-Met-Gln-Val-Trp-Phe-Leu-Ser-Arg-Lys-Asn-Thr-Gly-Thr-Glu-Glu-Thr oder immunogenen Fragment oder hiermit überlappenden immunogenen Peptidfragmenten.

Abb. 1

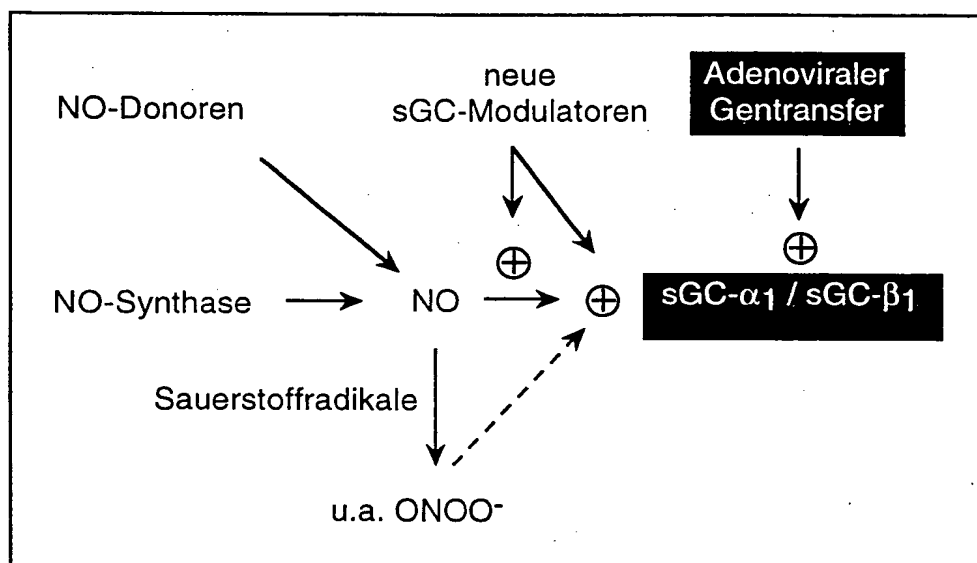
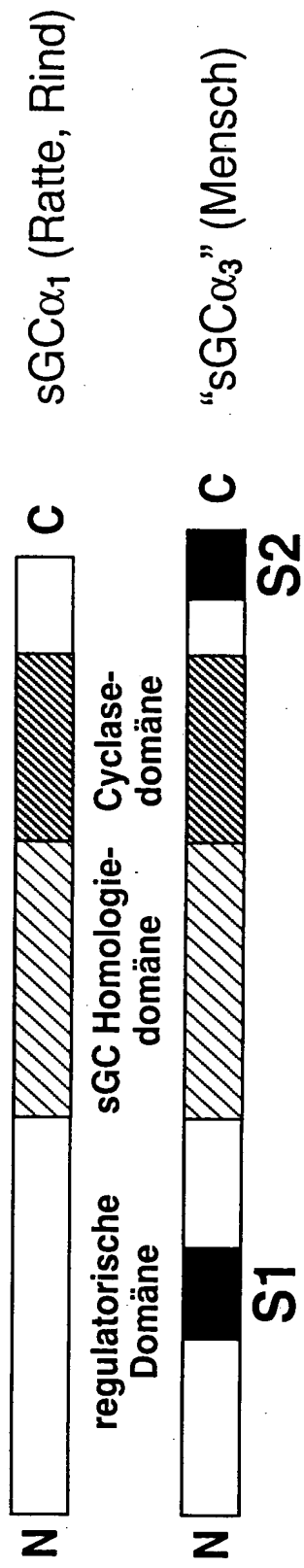
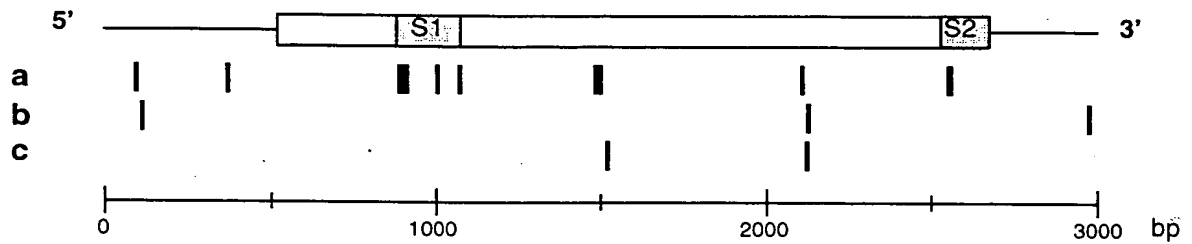




Abb. 2



## Abb. 3

**a: Nukleotid-Insertionen**

C95, C367, T891, G900, T903, G913, T1006, G1074, G1487, A1488, A1489, G2108, G2555, T2560

**b: Nukleotid-Deletionen**

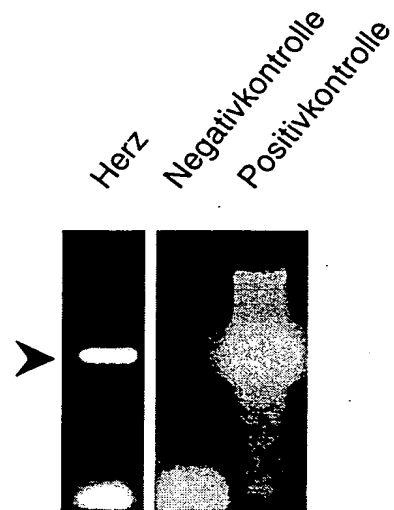
T zwischen G111 und T112, T zwischen T2128 und G2129, T zwischen G2975 und T2976

**c: Nukleotid-Austausche**

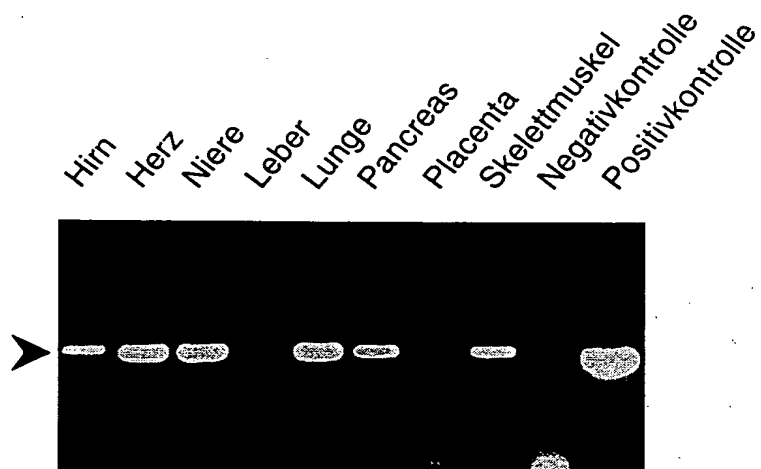
C1525 > G, G2125 > A

## Abb. 4

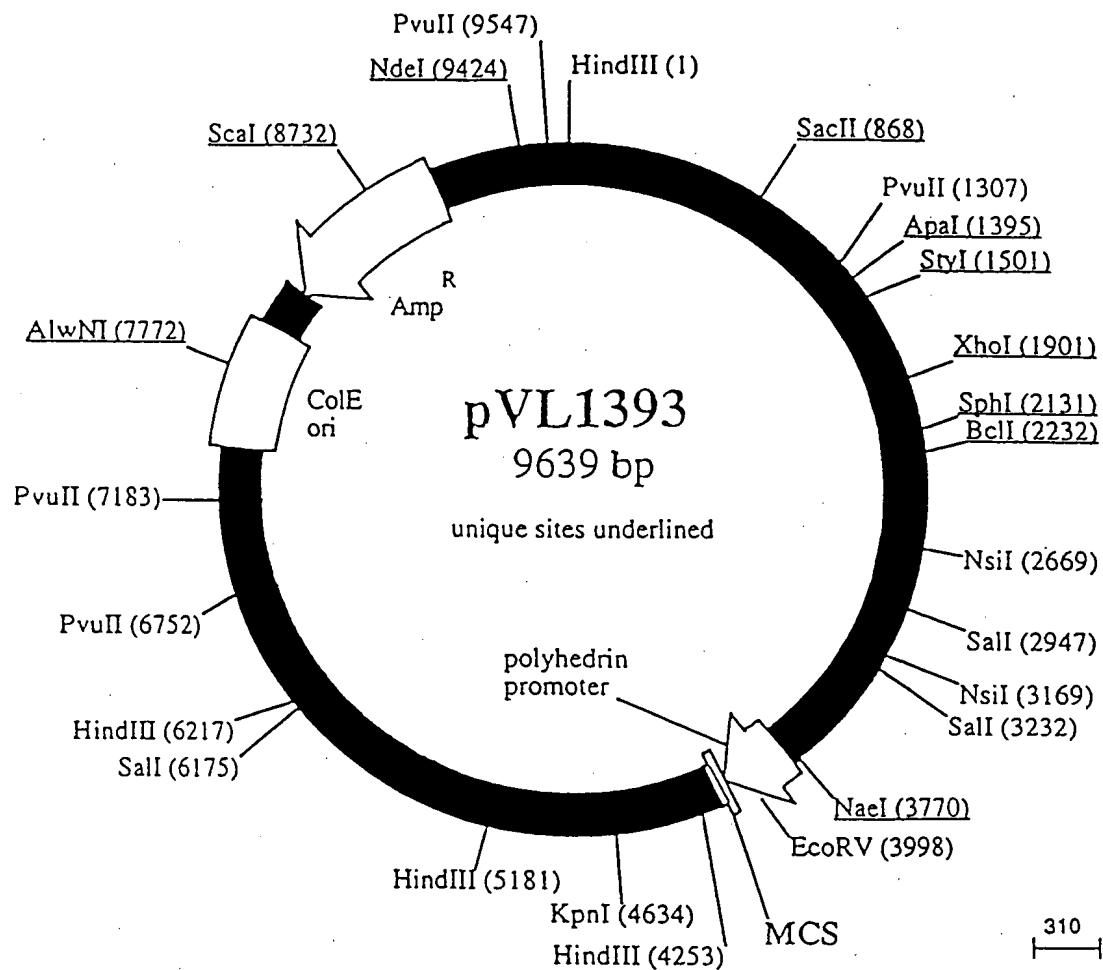
A

PCR-Nachweis  
von hsGC $\alpha$ 1

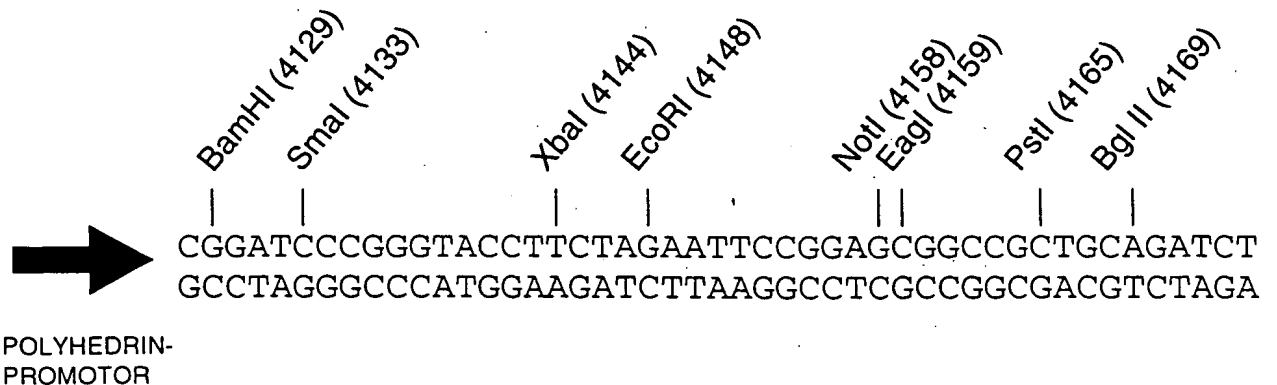
B

PCR-Nachweis  
von hsGC $\beta$ 1

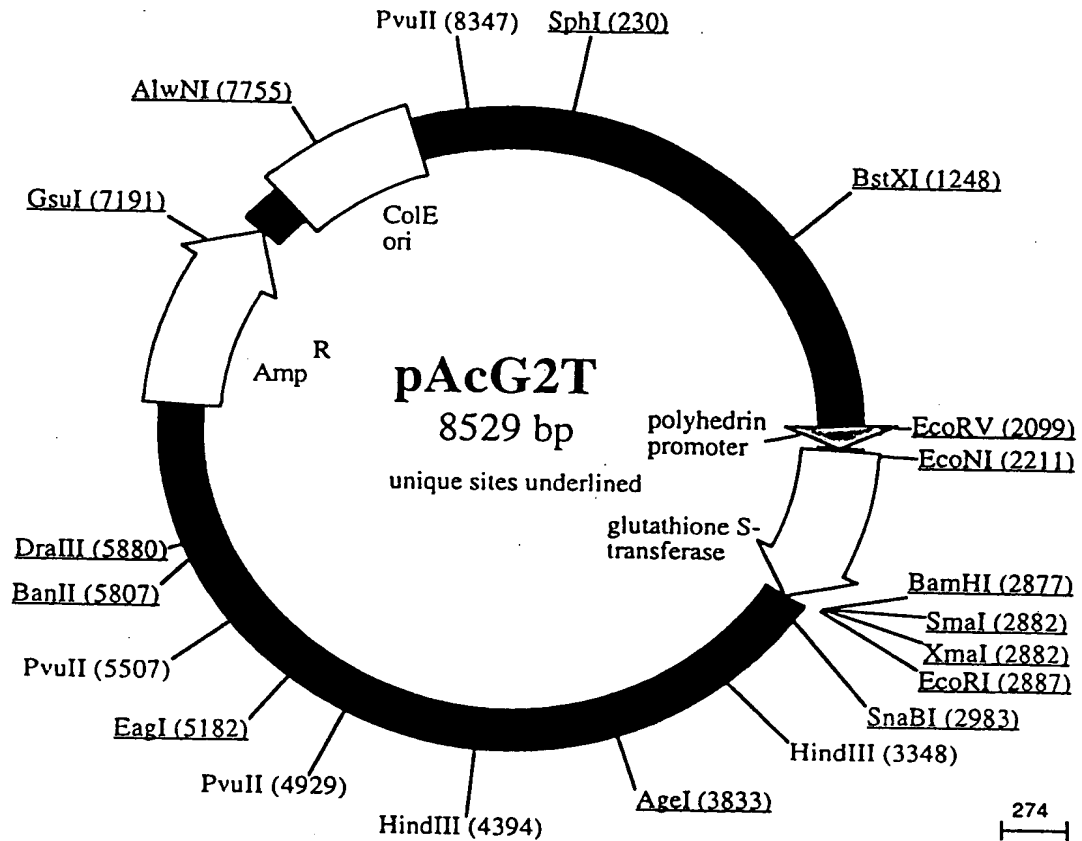
# Abb. 5 pVL1393 Baculovirus Transfer-Vektor



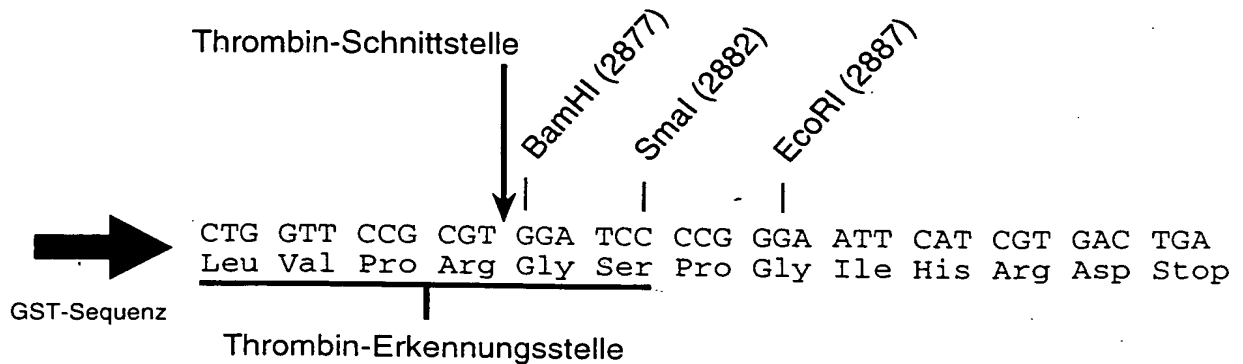
Die Multiple Klonierungsstelle (MCS) von pVL1393 mit den nur einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen



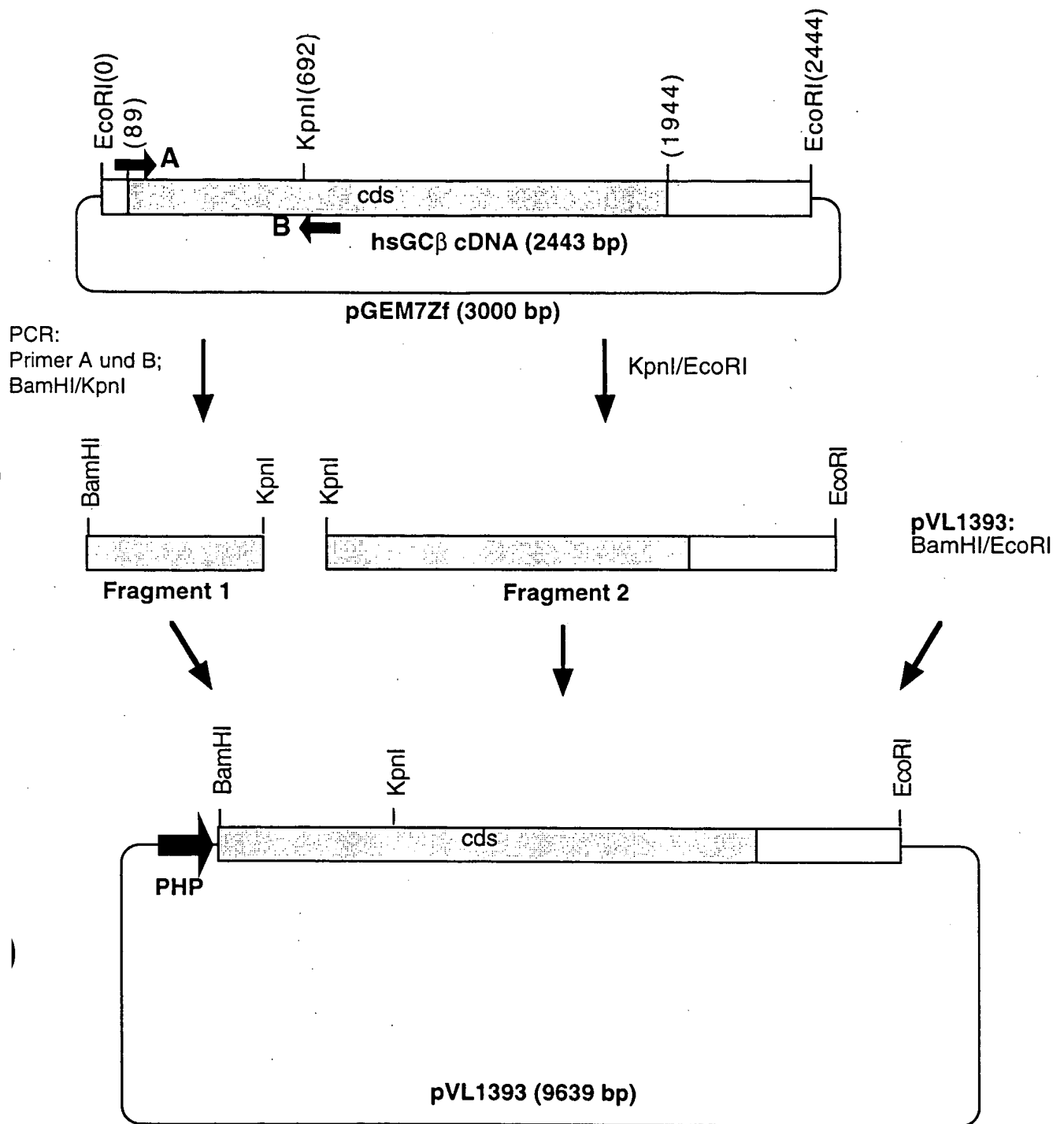
# Abb. 6 pAcG2T Baculovirus Transfer-Vektor



Die Multiple Klonierungsstelle von pAcG2T nach Glutathion-S-Transferase-Sequenz (GST) mit der Thrombinspaltungsstelle und den nur einfach vorkommenden Restriktionsschnittstellen

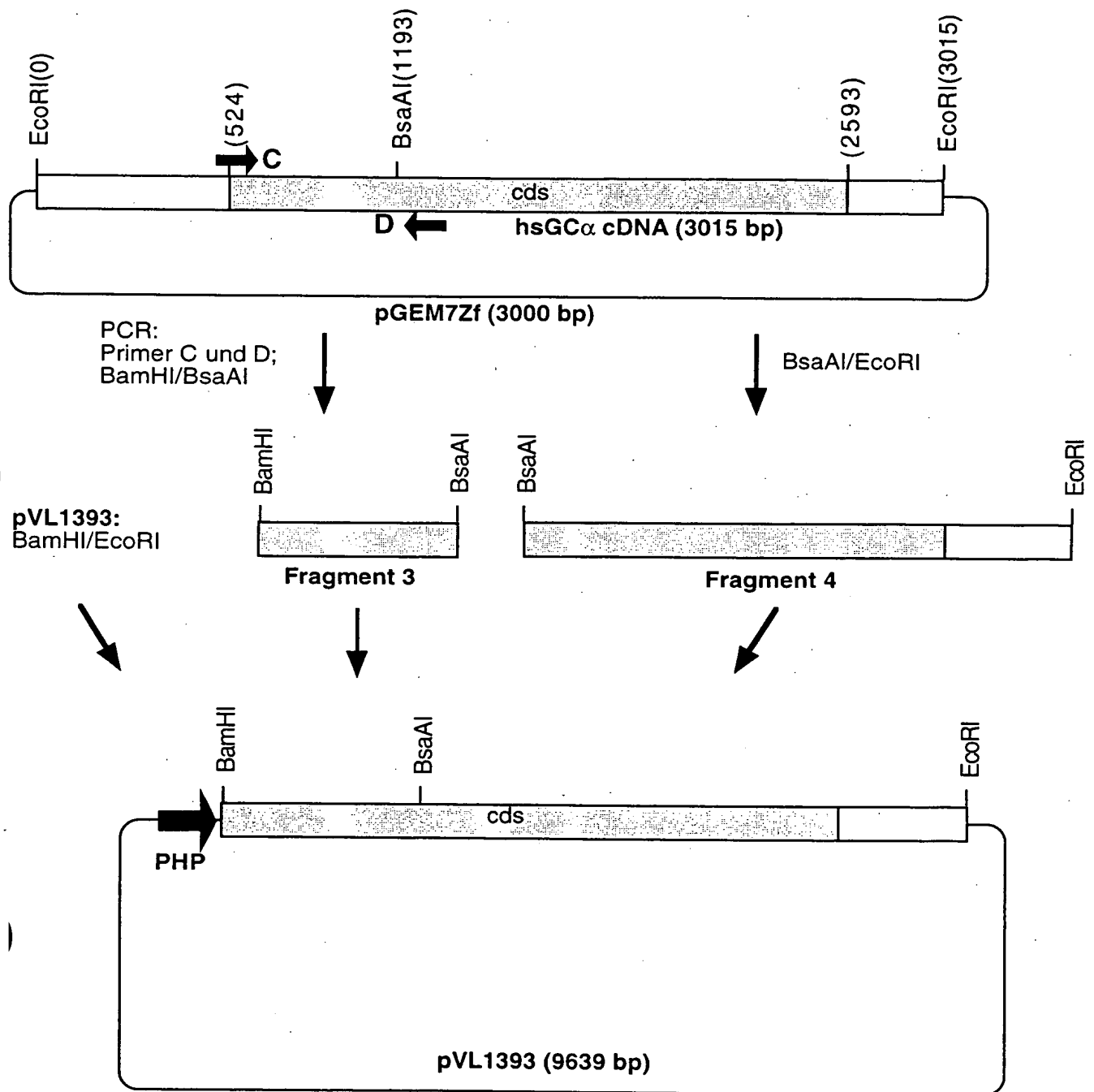


# Abb. 1. Klonierung von hsgcβ in pVL1393



**Primer: A** 5' AAAA GGATCC ATGTACGGATTTGTGAAT 3'  
BamHI (89) (116)

**B** 3' CCATGG GTCCTTAGTGCGTA 5'  
(692) KpnI (711)

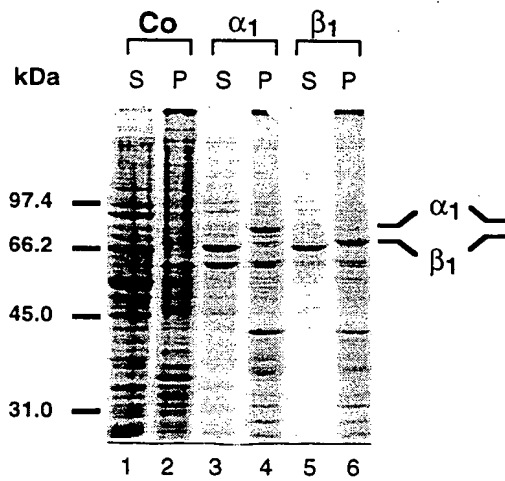
Abb. 8: Klonierung von hsGC $\alpha$  in pVL1393

Primer: C 5' AAAA GGATCC ATGTTCTGCACGAAGCTC 3'  
 BamHI (524) (541)

D 3' GGAGGGACGAAGGTATTA 5'  
 (1232) (1249)

## Abb. 9

## A SDS-PAGE



## B Immunoblot

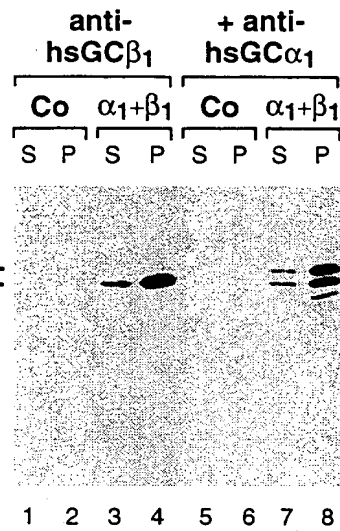
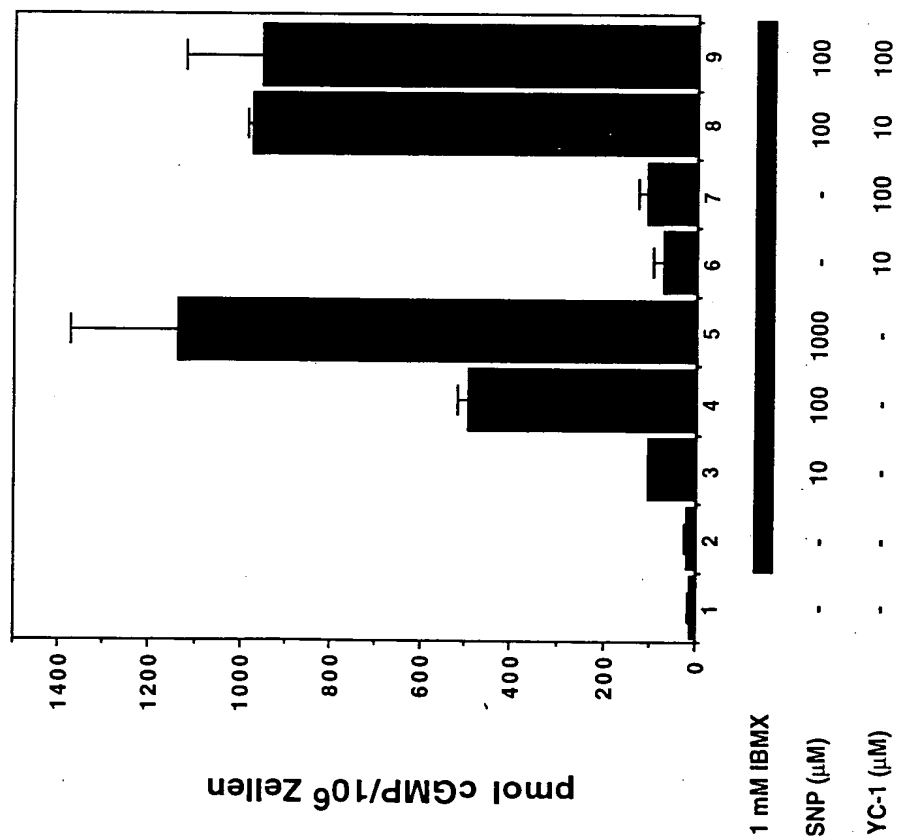




Abb. 10

A



B

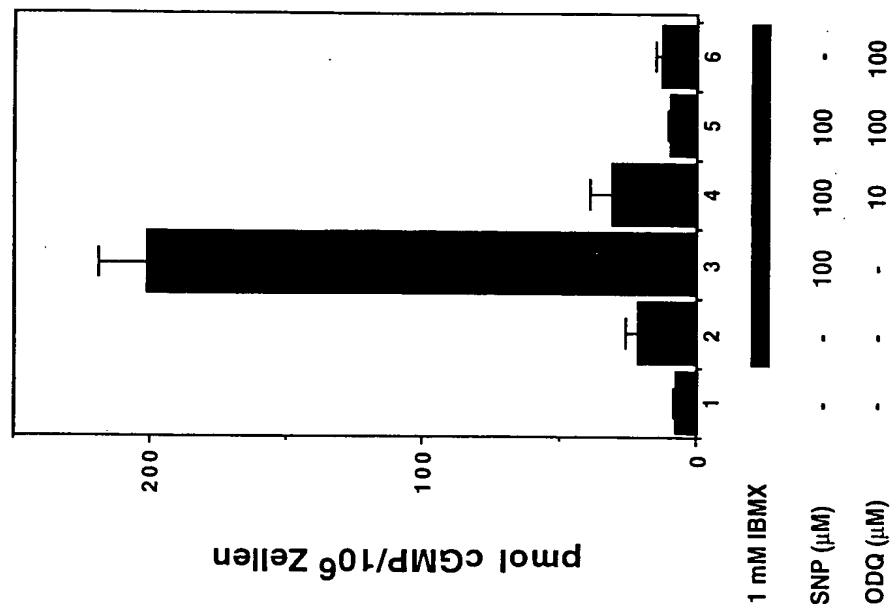


Abb. 11

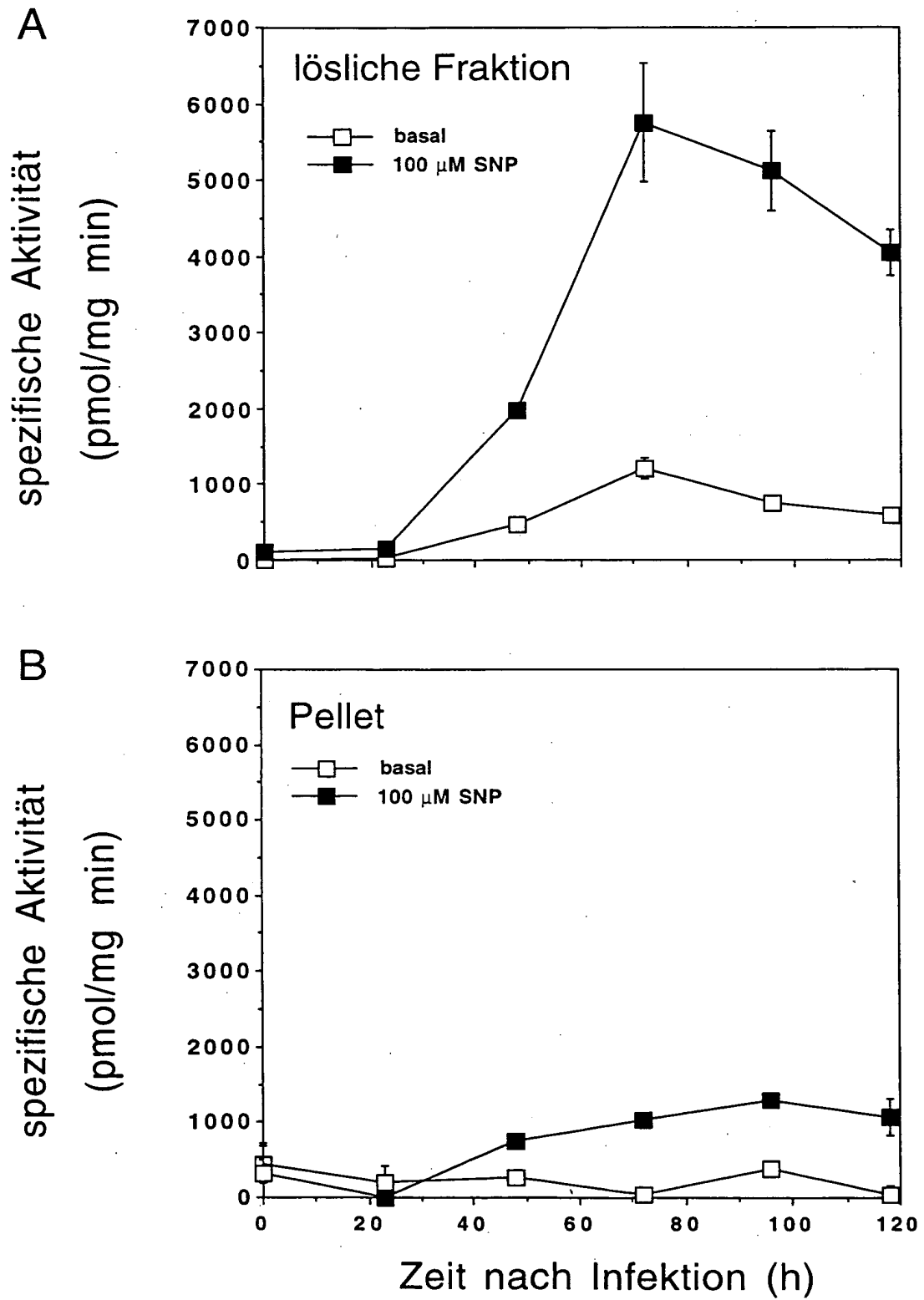


Abb. 12: Reinigung von GST-hsGAlpha1/beta1 an GSH-Sepharose 4B

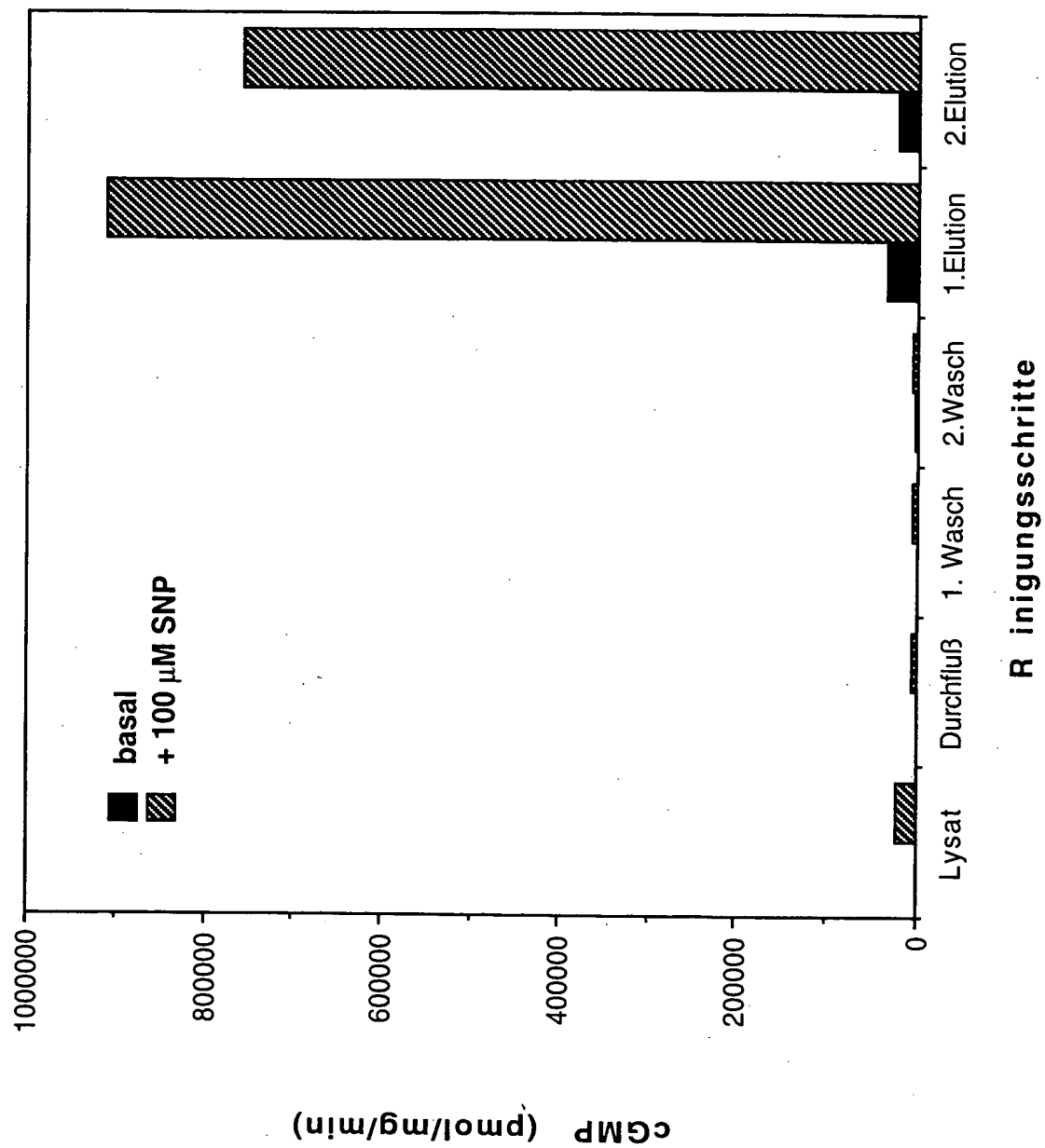


Abb. 13

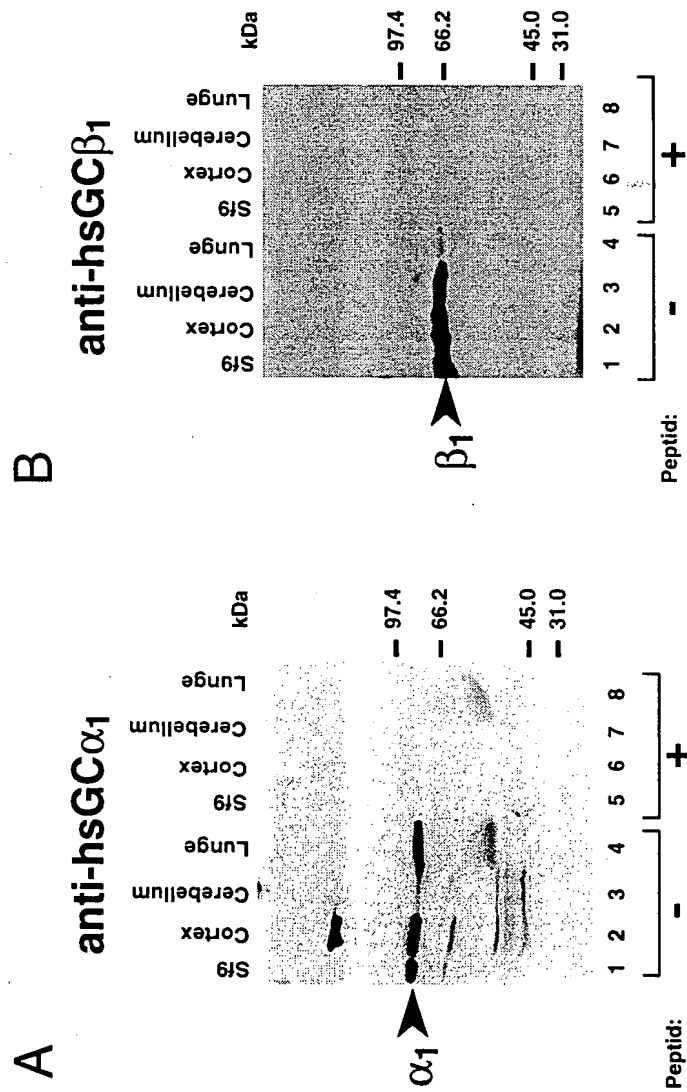


Abb. 14

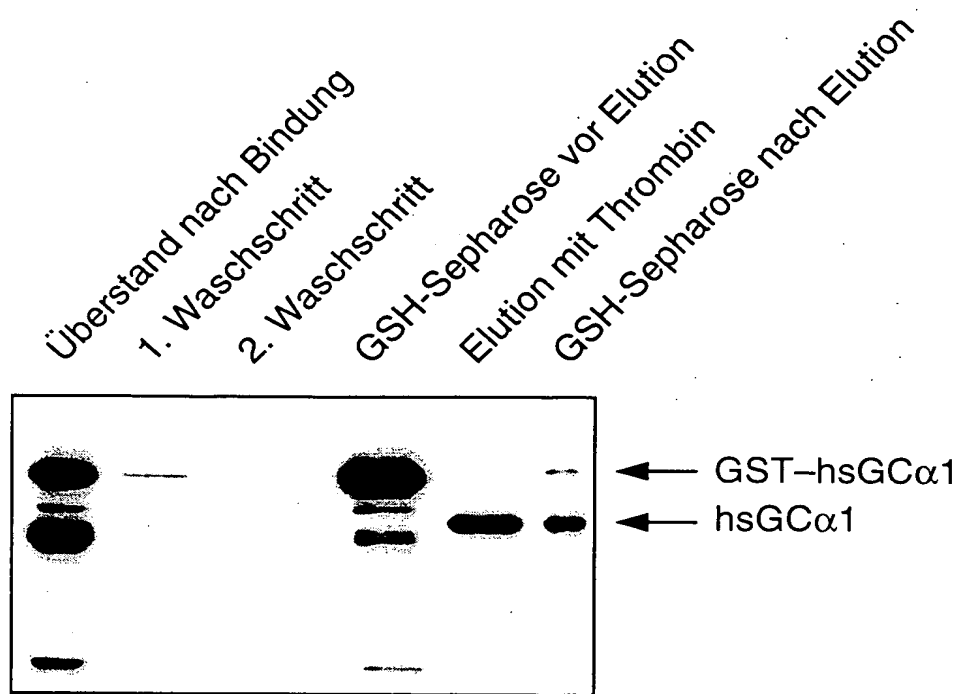


Abb. 15: Nachweis der Aufreinigung von hsGC  $\alpha 1/\beta 1$  im gefärbten SDS-Polyacrylamidgel

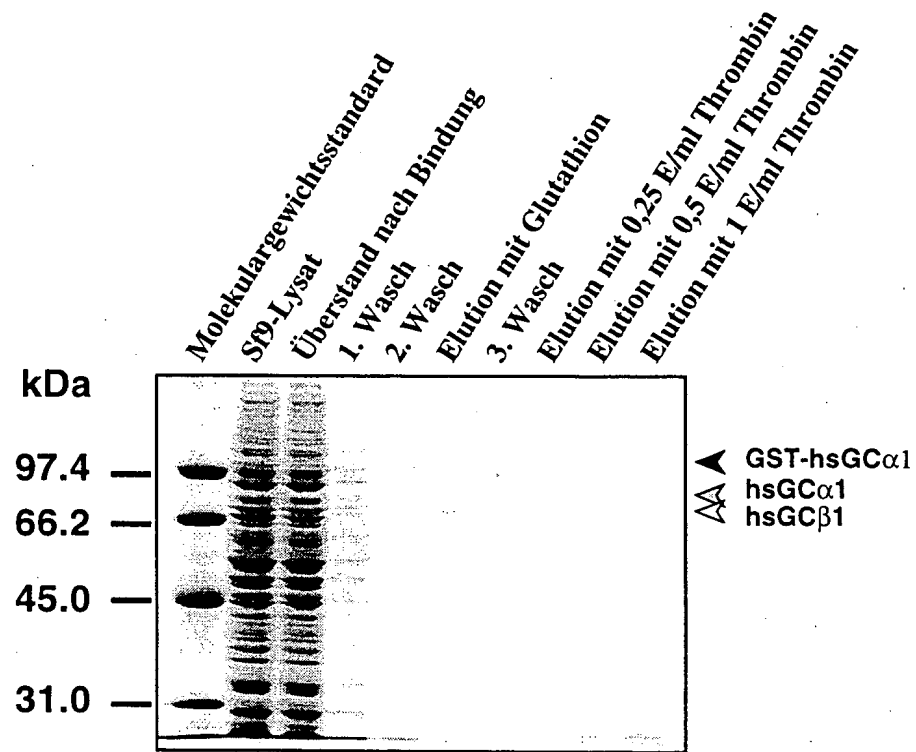


Abb. 16: Konstruktion des hsGC-Adenovektors

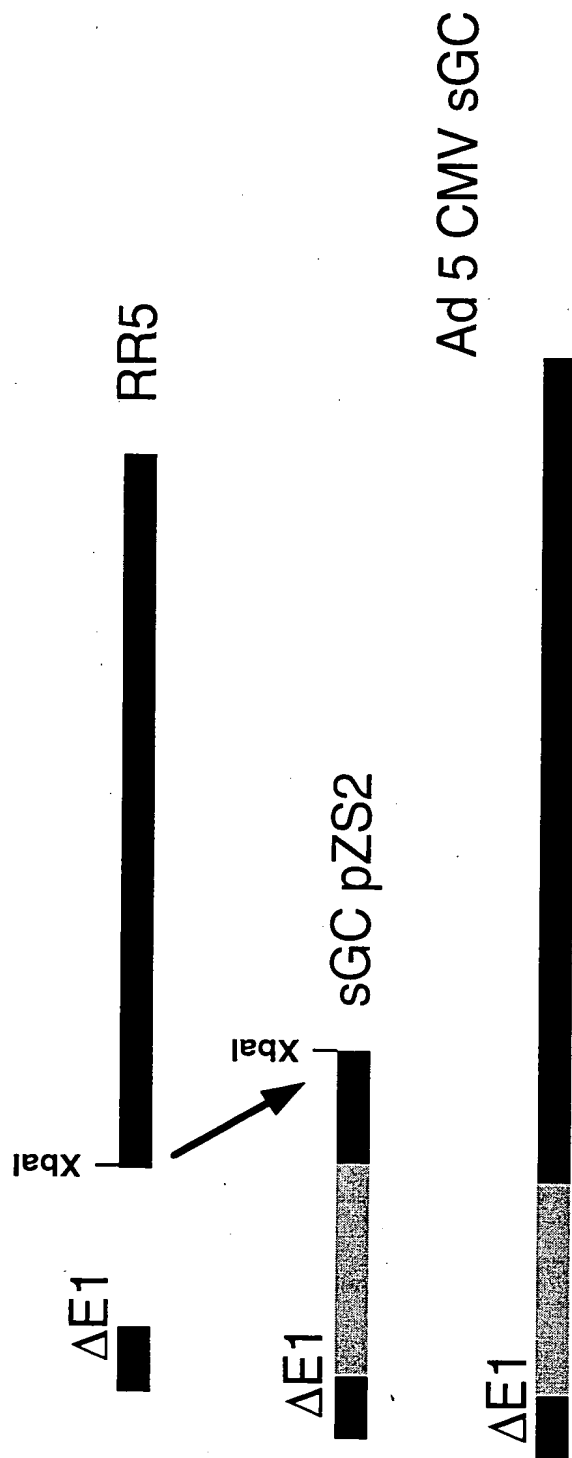
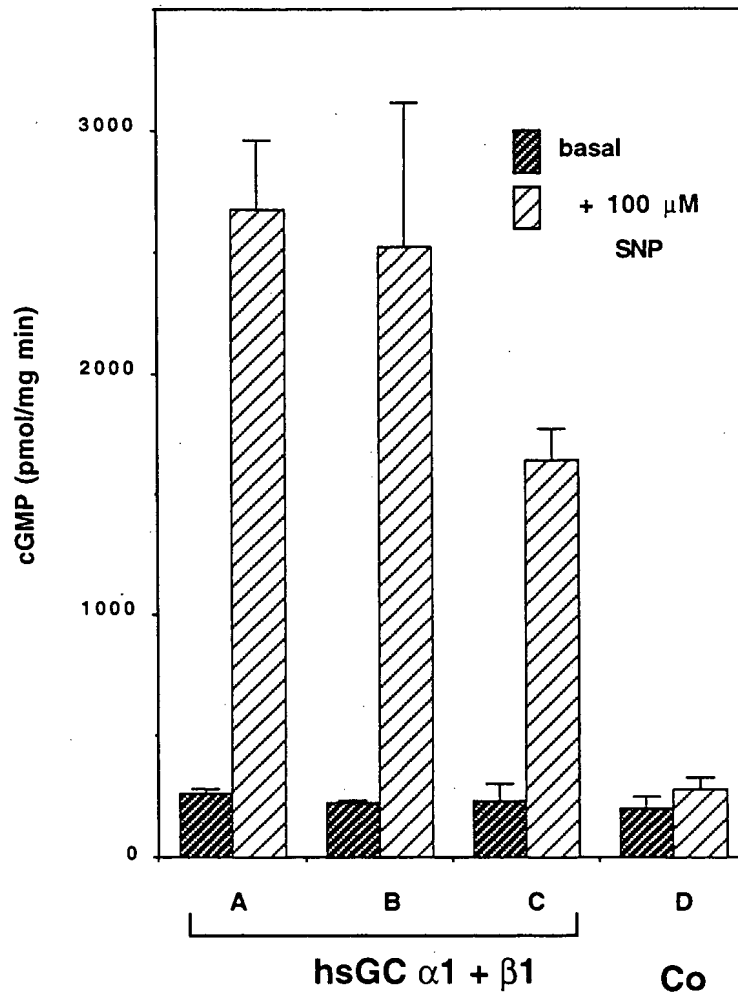


Abb. 17:  
Expression von humaner sGC in  
adenovirus-infizierten EA.hy926  
Zellen





## Abb. 18

CCCTTATGGC GATTGGGCGG CTGCAGAGAC CAGGACTCAG TTCCCCTGCC CTAGTCTGAG  
CCTAGTGGGT GGGACTCAGC TCAGAGTCAG TTTTCCAGAA GCAGGTTTCA GTGCAGAGTT  
TTCCTACACT TTTCTGCGC TAGAGCAGCG AGCAGCCTGG AACAGACCCA GGCGGAGGAC  
ACCTGTGGGG GAGGGAGCGC CTGGAGGAGC TTAGAGACCC CAGCCGGGCG TGATCTCACC  
ATGTGCGGAT TTGCGAGGCG CGCCCTGGAG CTGCTAGAGA TCCGGAAGCA CAGCCCCGAG  
GTGTGCGAAG CCACCAAGAC TCGGCTCTT GGAGAAAGCG TGAGCAGGGG GCCACCGCGG  
TCTCCGCGCC TGTCTGCACC CTGTGCGCTG AGCTGCCTGA CAGTGACAAT GACATCCAG  
TTACCAGTGT CTTGAATTG ATAGTGGCTT CTGTTTGTCA GTCTCATATA AGAACTACAG  
CTCATCAGGA GGAGATCGCA GCAGGGTAAG AGACACCAAC ACCATGTTCT GCACGAAGCT  
CAAGGATCTC AAGATCACAG GAGAGTGTCC TTTCTCCTTA CTGGCACCAG GTCAAGTTCC  
TAACGAGTCT TCAGAGGAGG CAGCAGGAAG CTCAGAGAGC TGCAAAGCAA CCGTGCCCAT  
CTGTCAAGAC ATTCTGAGA AGAACATACA AGAAAGTCTT CCTCAAAGAA AAACCAGTCG  
GAGCCGAGTC TATCTTCACA CTTTGGCAGA GAGTATTTGC AAAGTATTTT TCCCAGAGTT  
TGAACGGCTG AATGTTGCAC TTCAGAGAAC ATTGGCAAAG CACAAAATAA AAGAAAGCAG  
GAAATCTTTG GAAAGAGAAG ACTTTGAAA AACAATTGCA GAGCAAGCAG TTGCAGCAGG  
AGTTCCAGTG GAGGTTATCA AAGAATCTCT TGGTGAAGAG GTTTTTAAAA TATGTTACGA  
GGAAGATGAA AACATCCTTG GGGTGGTTGG AGGCACCTT AAAGATTTTT TAAACAGCTT  
CAGTACCCTT CTGAAACAGA GCAGCCATTG CCAAGAAGCA GGAAAAAGGG GCAGGCTTGA  
GGACGCCTCC ATTCTATGCC TGGATAAGGA GGATGATTTT CTACATGTTT ACTACTTCTT  
CCCTAAGAGA ACCACCTCCC TGATTCTTCC CGGCATCATA AAGGCAGCTG CTCACGTATT  
ATATGAAACG GAAGTGGAAG TGTCGTTAAT GCCTCCCTGC TTCCATAATG ATTGCAGCGA  
GTTTGTGAAT CAGCCCTACT TGTTGTACTC CGTTCACATG AAAAGCACCA AGCCATCCCT  
GTCCCCCAGC AAACCCCACT CCTCGCTGGT GATTCCCACA TCGCTATTCT GCAAGACATT  
TCCATTCCAT TTCATGTTTG ACAAAGATAT GACAATTCTG CAATTGGCA ATGGCATCAG  
AAGGCTGATG AACAGGAGAG ACTTTCAAGG AAAGCCTAAT TTTGAAGAAT ACTTTGAAAT  
TCTGACTCCA AAAATCAACC AGACGTTTAG CGGGATCATG ACTATGTTGA ATATGCAGTT  
TGTTGTACGA GTGAGGAGAT GGGACAAC TC GTGAAGAAA TCTTCAAGGG TTATGGACCT  
CAAAGGCCAA ATGATCTACA TTGTTGAATC CAGTGCAATC TTGTTTTTGG GGTACCCTG  
TGTGGACAGA TTAGAAGATT TTACAGGACG AGGGCTCTAC CTCTCAGACA TCCCAATTCA  
CAATGCACTG AGGGATGTGG TCTTAATAGG GGAACAAGCC CGAGCTCAAG ATGGCCTGAA  
GAAGAGGCTG GGGAAGCTGA AGGCTACCCT TGAGCAAGCC CACCAAGCCC TGGAGGAGGA  
GAAGAAAAAG ACAGTAGACC TTCTGTGCTC CATATTTCCC TGTGAGGTTG CTCAGCAGCT  
GTGGCAAGGG CAAGTTGTGC AAGCCAAGAA GTTCAGTAAT GTCACCATGC TCTTCTCAGA  
CATCGTTGGG TTTACTGCCA TCTGCTCCCA GTGCTCACC GTCAGAGTCA TCACCATGCT  
CAATGCACTG TACACTCGCT TCGACCAGCA GTGTGGAGAG CTGGATGTCT ACAAGGTGGA  
GACCATTGGC GATGCCTATT GTGTAGCTGG GGGATTACAC AAAGAGAGTG ATACTCATGC  
TGTTTCAGATA GCGCTGATGG CCCTGAAGAT GATGGAGCTC TCTGATGAAG TTATGTCTCC  
CCATGGAGAA CTTATCAAGA TGCGAATTGG ACTGCACTCT GGATCAGTTT TTGCTGGCGT  
CGTTGGAGTT AAAATGCCCC GTTACTGTCT TTTTGGAAC AATGTCCTC TGGCTAACAA  
ATTTGAGTCC TGCAGTGTAC CACGAAAAAT CAATGTCAGC CCAACAACCT ACAGATTACT  
CAAAGACTGT CCTGGTTTCG TGTTTACCCC TCGATCAAGG GAGGAACCTT CACCAAACTT  
CCCTAGTGAA ATCCCCGGA TCTGCCATTT TCTGGATGCT TACCAACAAG GAACAAACTC  
AAAACCATGC TTCCAAAAGA AAGATGTGGA AGATGGCAAT GCCAATTTTT TAGGCAAGC  
ATCAGGAATA GATTAGCAAC CTATATACCT ATTTATAAGT CTTTGGGGTT TGAATCATTG  
AAGATGTGTA GAGCCTCTGA AAGCACTTTA GGGATTGTAG ATGGCTAACA AGCAGTATTA  
AAATTTAGG AGCCAAGTCA CAATCTTTCT CCTGTTTAA ATGACAAAAT GTACTCACTT  
CAGTACTTCA GCTCTTCAAG AAAAAAAAAA AAACCTTAAA AAGCTACTTT TGTGGGAGTA  
TTTCTATTAT ATAACCAGCA CTTACTACCT GTACTCAAAA TTCAGCACCT TGTACATATA  
TCAGATAATT GTAGTCAATT GTACAACTG ATGGAGTCAC CTGCAATCTC ATATCCTGGT  
GGAATGCCAT GGTATTAAAA GTGTGTTTGT GATAGTGTCT TCAAAAAAAA AAAAAAAA  
AAAAAAA AAAA

MetTyrGlyPheValAsnHisAlaLeuGluLeuLeuValIleArgAsn  
TyrGlyProGluValTrpGluAspIleLysLysGluAlaGlnLeuAsp  
GluGluGlyGlnPheLeuValArgIleIleTyrAspAspSerLysThr  
TyrAspLeuValAlaAlaAlaSerLysValLeuAsnLeuAsnAlaGly  
GluIleLeuGlnMetPheGlyLysMetPhePheValPheCysGlnGlu  
SerGlyTyrAspThrIleLeuArgValLeuGlySerAsnValArgGlu  
PheLeuGlnAsnLeuAspAlaLeuHisAspHisLeuAlaThrIleTyr  
ProGlyMetArgAlaProSerPheArgCysThrAspAlaGluLysGly  
LysGlyLeuIleLeuHisTyrTyrSerGluArgGluGlyLeuGlnAsp  
IleValIleGlyIleIleLysThrValAlaGlnGlnIleHisGlyThr  
GluIleAspMetLysValIleGlnGlnArgAsnGluGluCysAspHis  
ThrGlnPheLeuIleGluGluLysGluSerLysGluGluAspPheTyr  
GluAspLeuAspArgPheGluGluAsnGlyThrGlnGluSerArgIle  
SerProTyrThrPheCysLysAlaPheProPheHisIleIlePheAsp  
ArgAspLeuValValThrGlnCysGlyAsnAlaIleTyrArgValLeu  
ProGlnLeuGlnProGlyAsnCysSerLeuLeuSerValPheSerLeu  
ValArgProHisIleAspIleSerPheHisGlyIleLeuSerHisIle  
AsnThrValPheValLeuArgSerLysGluGlyLeuLeuAspValGlu  
LysLeuGluCysGluAspGluLeuThrGlyThrGluIleSerCysLeu  
ArgLeuLysGlyGlnMetIleTyrLeuProGluAlaAspSerIleLeu  
PheLeuCysSerProSerValMetAsnLeuAspAspLeuThrArgArg  
GlyLeuTyrLeuSerAspIleProLeuHisAspAlaThrArgAspLeu  
ValLeuLeuGlyGluGlnPheArgGluGluTyrLysLeuThrGlnGlu  
LeuGluIleLeuThrAspArgLeuGlnLeuThrLeuArgAlaLeuGlu  
AspGluLysLysLysThrAspThrLeuLeuTyrSerValLeuProPro  
SerValAlaAsnGluLeuArgHisLysArgProValProAlaLysArg  
TyrAspAsnValThrIleLeuPheSerGlyIleValGlyPheAsnAla  
PheCysSerLysHisAlaSerGlyGluGlyAlaMetLysIleValAsn  
LeuLeuAsnAspLeuTyrThrArgPheAspThrLeuThrAspSerArg  
LysAsnProPheValTyrLysValGluThrValGlyAspLysTyrMet  
ThrValSerGlyLeuProGluProCysIleHisHisAlaArgSerIle  
CysHisLeuAlaLeuAspMetMetGluIleAlaGlyGlnValGlnVal  
AspGlyGluSerValGlnIleThrIleGlyIleHisThrGlyGluVal  
ValThrGlyValIleGlyGlnArgMetProArgTyrCysLeuPheGly  
AsnThrValAsnLeuThrSerArgThrGluThrThrGlyGluLysGly  
LysIleAsnValSerGluTyrThrTyrArgCysLeuMetSerProGlu  
AsnSerAspProGlnPheHisLeuGluHisArgGlyProValSerMet  
LysGlyLysLysGluProMetGlnValTrpPheLeuSerArgLysAsn  
ThrGlyThrGluGluThrLysGlnAspAspAspEnd

14-08-98

70

## Abb. 22

PheThrProArgSerArgGluGluLeuProProAsnPhePro

## Abb. 23

LysGlyLysLysGluProMetGlnValTrpPheLeuSerArgLysAsn  
ThrGlyThrGluGluThr

## Abb. 24

oberer Primer

AAAAGGATCC ATGTTCTGCA CGAAGCTC

unterer Primer

ATTATGGAAG CAGGGAGG

## Abb. 25

oberer Primer

AAAAGGATCC ATGTACGGAT TTGTGAAT

unterer Primer

ATGCGTGATT CCTGGGTACC



Creation date: 01-20-2004  
Indexing Officer: TKASSAYE - TILAHUN KASSAYE  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 09762767

Legal Date: 06-27-2003

No.	Doccode	Number of pages
1	SRNT	124

Total number of pages: 124

Remarks:

Order of re-scan issued on .....

1. *Introduction*

2. *Methodology*

3. *Results*

4. *Discussion*

5. *Conclusion*

6. *References*

7. *Appendix*

8. *Index*

9. *Glossary*

10. *Notes*

11. *Footnotes*

12. *Endnotes*

13. *References*

14. *Appendix*

15. *Index*

16. *Glossary*

17. *Notes*

18. *Footnotes*